



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação
Departamento de Engenharia Biomédica



RADIAÇÃO IONIZANTE DA MAMOGRAFIA: DIAGNÓSTICO OU INDUÇÃO AO CÂNCER?

Autora: Clarissa F. C. Lima Loureiro

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Santos Mühlen

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Elétrica. Área de concentração: **Engenharia Biomédica.**

Banca Examinadora

Prof. Dr. Sérgio Santos Mühlen (presidente) — DEB/FEEC/UNICAMP

Profa. Dra. Vera Lúcia da Silveira Nantes Button — DEB/FEEC/UNICAMP

Profa. Dra. Annie France Frère Slaets — UMC

Campinas – SP
28/02/2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

L934r

Loureiro, Clarissa Fernanda Correia Lima Loureiro
Radiação ionizante da mamografia: diagnóstico ou indução ao
câncer? / Clarissa Fernanda Correia Lima Loureiro. --Campinas, SP:
[s.n.], 2011.

Orientador: Sérgio Santos Muhlen.
Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação.

1. Mamografia. 2. Câncer de mama. 3. Radiação ionizante. 4.
Radiologia médica - Medidas de segurança. I. Muhlen, Sérgio
Santos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Elétrica e de Computação. III. Título.

Título em Inglês: Ionizing radiation from mammography: diagnosis or cancer induction?

Palavras-chave em Inglês: Mammography, Breast cancer, Ionizing radiation, Medical radiology -
Security measures

Área de concentração: Engenharia Biomédica

Titulação: Mestre em Engenharia Elétrica

Banca examinadora: Vera Lúcia da Silveira Nantes Button, Annie France Frère Slaets

Data da defesa: 28/02/2011

Programa de Pós Graduação: Engenharia Elétrica

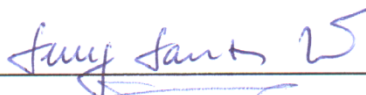
COMISSÃO JULGADORA - TESE DE MESTRADO

Candidata: Clarissa Fernanda Correia Lima Loureiro

Data da Defesa: 28 de fevereiro de 2011

Título da Tese: "Radiação Ionizante da Mamografia: Diagnóstico ou Indução ao Câncer?"

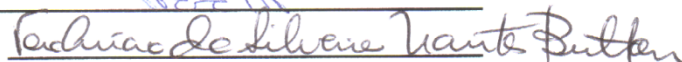
Prof. Dr. Sérgio Santos Muhlen (Presidente):



Profa. Dra. Annie France Frère Slaets:



Profa. Dra. Vera Lúcia da Silveira Nantes Button:



Resumo

Estabelecer os efeitos biológicos e níveis seguros de exposição à radiação ionizante é um objetivo a ser alcançado até os dias de hoje. Mamografia é um exame importante na detecção precoce de tumores na mama, mas desde que os genes BRCA1 e BRCA2 foram identificados como a causa principal de câncer de mama hereditário, existe uma preocupação crescente em relação à exposição às radiações ionizantes de pacientes portadoras de mutações nestes genes. A exposição poderia induzir um aumento nas mutações nos genes BRCA e outros supressores e promover o desenvolvimento do tumor nestas pacientes. Neste trabalho é proposto um estudo experimental *in vitro* inicial com o objetivo de determinar o nível de radiação que desencadeia mutações detectáveis nos genes BRCA, e quantificar um nível mais seguro de radiação nas mamografias de pacientes portadoras de mutações em alelo desses genes. Células de mama provenientes de uma paciente foram cultivadas e irradiadas com diferentes doses de raios X, gerados por um mamógrafo comercial. Os resultados mostram que radiações ionizantes promovem alterações mensuráveis nas células de mama cultivadas.

Palavras-chave: *mamografia, câncer de mama, radiação ionizante, BRCA, risco radiológico.*

Abstract

Establishing the biological effects and the safe level of exposure to ionizing radiation remains, so far, an objective to be reached. Mammography is an important exam in the early detection of breast tumors, but since the genes BRCA1 and BRCA2 were identified as a main cause of hereditary breast cancer, there is growing concern of exposing patients carrying those mutations to ionizing radiation. It could increase mutations in these genes and other suppressors, and promote the development of tumor in those patients. In this study we propose an *in vitro* initial experiment aiming to determine the radiation trigger level for detectable mutations in genes BRCA, and thus a safer level of radiation due to mammography for patients carrying a mutated allele of the genes BRCA1 or BRCA2. Breast cells from one patient were cultivated and irradiated with different doses of X-rays generated by commercial mammography equipment. The results have shown that exposition to ionizing radiation promotes measurable alterations in breast cell grown.

Keywords: *mammography, breast cancer, ionizing radiation, BRCA, radiologic risk.*

Dedico este trabalho ao meu pai Ricardo Loureiro (in memorian) pelo seu exemplo de vida, incentivo, dedicação, inspiração e amor. Dedico ao meu tio, Ronaldo Loureiro (in memorian), pela alegria e vontade de ajudar a todos. Dedico à minha mãe, Fernanda Cecília C. Lima Loureiro, cuja bondade ultrapassa os limites deste mundo, pela força, ajuda, amizade e incentivos renovados, todos os dias da minha vida.

Agradecimentos

Agradeço ao professor Sérgio S. Mühlen, pela orientação deste trabalho, e pelo apoio durante a realização do mesmo.

Agradeço à professora Carmen S. Bertuzzo, por ter possibilitado seguir minha pesquisa na área do câncer, pela idéia da tese, por ter me deixado utilizar seu laboratório, e por ter me passado seu conhecimento.

Agradeço ao técnico Jorge, pela sua ajuda na utilização da câmara de ionização e disponibilidade.

Ao pessoal do laboratório da genética médica na Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.

À professora Vera L. Button pelo apoio e amizade.

Ao professor Hugo Figueroa, que sempre me ajudou e me apoiou em todos os momentos desde que cheguei a Campinas.

Aos colegas do DEB e da FEEC, que se tornaram meus amigos e minha família em Campinas, em especial à Anna Luiza, Johannes Dantas, Davi Anders, Tiago Machado e Gilliard Nardel que me ajudaram e dividiram comigo várias alegrias e tristezas durante este trabalho.

Agradeço imensamente aos meus irmãos Arthur e Ricardo Loureiro, aos meus tios, primos e familiares que sempre deram muito amor, força, apoio moral e emocional para continuar na área que amo.

Agradeço carinhosamente ao meu namorado Leonardo, pela sua dedicação, companheirismo e amor durante todos os meses deste trabalho.

Ao CNPq pelo financiamento de parte deste trabalho.

A Deus.

Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIACÕES.....	XIV
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVO	3
CAPÍTULO 2. CÂNCER DE MAMA, BRCA E MAMOGRAFIA.....	4
2.1 CÂNCER DE MAMA	4
2.2 FATORES DE RISCO	5
2.3 EXAMES DE DIAGNÓSTICO.....	6
2.4 BRCA E RADIAÇÃO IONIZANTE: RISCOS E DANOS	6
CAPÍTULO 3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	11
3.1 RADIAÇÕES.....	11
3.1.1 Ionização.....	11
3.1.2 Radiações Ionizantes.....	12
3.2 PROCESSOS DE PRODUÇÃO DOS RAIOS X	12
3.2.1 Radiação Característica.....	12
3.2.2 <i>Bremsstrahlung</i>	14
3.3 FATORES QUE MODIFICAM A INTENSIDADE DO FEIXE DE RAIOS X	15
3.3.1 O tubo de Raios X.....	16
3.3.2 Material do Alvo.....	16
3.3.3 Tensão no Tubo (kVp)	17
3.3.4 Corrente no Tubo (mA)	17
3.3.5 Filtração	17
3.3.6 Atenuação dos Feixes de Raios X.....	18
3.3.7 Geradores	19

3.4	MAMOGRAFIA	19
3.4.1	Qualidade da Imagem Mamográfica	19
3.4.2	Considerações Técnicas	20
3.5	PARÂMETROS FÍSICOS	20
3.5.1	Qualidade da Radiação.....	20
3.6	DESEMPENHO DO SISTEMA MAMOGRÁFICO	22
CAPÍTULO 4. INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO IONIZANTE COM A MATÉRIA.....		23
4.1	ABSORÇÃO DE ENERGIA.....	23
4.2	MEDIÇÃO DE RADIAÇÃO: DOSIMETRIA.....	23
4.2.1	Quantidades para descrever um feixe de radiação.....	24
4.3	EXPOSIÇÃO	25
4.4	TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA: UM PROCESSO DE DOIS ESTÁGIOS – DOSE ABSORVIDA E KERMA	26
4.4.1	Dose Absorvida	26
4.4.2	Kerma.....	26
4.4.3	Diferença entre Kerma e Dose Absorvida.....	27
4.5	O FATOR ROENTGEN-RAD.....	27
4.6	MEDIÇÕES COM CÂMARA DE IONIZAÇÃO.....	28
4.7	EFEITOS BIOLÓGICOS DAS RADIAÇÕES IONIZANTES.....	29
4.7.1	Radiação Ionizante: Mecanismo de Ação.....	29
4.7.2	Resposta das Células à Radiação.....	30
4.7.3	Morte Celular Radioinduzida: Clonogênica e Apoptose.....	31
4.7.4	Resposta dos Tecidos à Radiação	32
4.7.5	Avaliação dos Efeitos da Radiação	33
4.7.6	Cariótipo.....	34
CAPÍTULO 5. MATERIAIS E MÉTODOS		35
5.1	METODOLOGIA EXPERIMENTAL	35
5.1.1	Preparação das Amostras.....	35
5.1.2	Exposição das Amostras.....	37
5.1.3	Análise das Amostras Irradiadas	40
CAPÍTULO 6. RESULTADOS		42

CAPÍTULO 7. DISCUSSÃO	45
CAPÍTULO 8. CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
APÊNDICE. GRÁFICOS DAS TAXAS DE CRESCIMENTO DOS TUBOS DE CULTURA	55

Lista de Figuras

Figura 1 – Geração de raios X característicos	13
Figura 2 – Geração de raios X por <i>bremsstrahlung</i>	14
Figura 3 – Espectro total do feixe de raios X gerado com alvo de tungstênio para tensão do tubo de 90 kVp	15
Figura 4 – Tubo de raios X e montagem da carcaça	17
Figura 5 – Diferenças de atenuação dos raios X em função da energia dos fótons para diferentes tecidos que podem estar presentes na imagem mamográfica.....	21
Figura 6 – Tubo de cultura, Leighton, com as áreas demarcadas em caneta	36
Figura 7 – Mamógrafo do CAISM e a montagem dos experimentos.....	39
Figura 8 – Dosímetro da câmara de ionização na mesma localização da mama em um exame de mamografia	40
Figura 9 – Variação da taxa de crescimento (%) <i>versus</i> exposição (R).....	44
Figura 10 – Taxa de crescimento 1 antes e após a irradiação das células, variação angular entre as duas retas 1,20°.....	56
Figura 11 – Taxa de crescimento 2 antes e após a irradiação das células, variação angular entre as duas retas 1,05°.....	56
Figura 12 – Taxa de crescimento 3 antes e após a irradiação das células, variação angular entre as duas retas 1,61°.....	57
Figura 13 – Taxa de crescimento 4 antes e após a irradiação das células, variação angular entre as duas retas 1,68°.....	57
Figura 14 – Taxa de crescimento 5 antes e após a irradiação das células, variação angular entre as duas retas 2,56°.....	58
Figura 15 – Taxa de crescimento 6 antes e após a irradiação das células, variação angular entre as duas retas 4,83°.....	58

Figura 16 – Taxa de crescimento 7 antes e após a irradiação das células, variação angular entre as duas retas 6,29°	59
Figura 17 – Taxa de crescimento 8 antes e após a irradiação das células, variação angular entre as duas retas 6,50°	59
Figura 18 – Taxa de crescimento 9 antes e após a irradiação das células, variação angular entre as duas retas 8,22°	60
Figura 19 – Taxa de crescimento 10 antes e após a irradiação das células, variação angular entre as duas retas 8,79°	60
Figura 20 – Taxa de crescimento 11 antes e após a irradiação das células, variação angular entre as duas retas 9,74°	61
Figura 21 – Taxa de crescimento 12 antes e após a irradiação das células, variação angular entre as duas retas 10,59°	61
Figura 22 – Taxa de crescimento 13 antes e após a irradiação das células, variação angular entre as duas retas 12,91°	62
Figura 23 – Taxa de crescimento 14 antes e após a irradiação das células, variação angular entre as duas retas 23,98°	62
Figura 24 – Taxa de crescimento 15 antes e após a irradiação das células, variação angular entre as duas retas 24,12°	63
Figura 25 – Taxa de crescimento 16 antes e após a irradiação das células, variação angular entre as duas retas 26,01°	63

Lista de Tabelas

Tabela I – Propriedades físicas de alguns elementos que compõem os tecidos.	21
Tabela II – Coeficientes de absorção de massa para diferentes tecidos em função da energia ou qualidade da radiação utilizada nos exames mamográficos (m^2/kg).....	22
Tabela III – Fator f para vários tecidos	28
Tabela IV – Protocolo de exposição de radiação do experimento 1	37
Tabela V – Protocolo de exposição de radiação do experimento 2.....	38
Tabela VI – Resultados do primeiro experimento	42
Tabela VII – Resultados do segundo experimento	43

Lista de Abreviações

BRCA1 – *Breast Cancer Gene 1*

BRCA2 – *Breast Cancer Gene 2*

CAISM – Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher – Hospital da Mulher “Professor José Aristodemo Pinotti”

CNEN – Comissão Nacional de Energia Nuclear

DEB – Departamento de Engenharia Biomédica

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (ácido desoxirribonucléico)

FCM – Faculdade de Ciências Médicas

FEEC – Faculdade de Engenharia Elétrica e Computação

ICRU – *International Commission on Radiological Units*

INCA – Instituto Nacional do Câncer

KERMA – *Kinetic Energy Released in the Medium*

OMS – Organização Mundial da Saúde

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

Capítulo 1. Introdução

SEGUNDO tipo mais frequente no mundo, o câncer de mama é o mais comum entre as mulheres, respondendo por 22% dos casos novos a cada ano, conforme dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2007).

Os tumores de mama e ovário são neoplasias extremamente frequentes na população afetando 1 a cada 8 mulheres em média. Estima-se que em 5% a 10% de todos os cânceres de mama e de ovário ocorram mutações em genes autossômicos, com padrão de herança dominante (Newman *et al.*, 1988).

No início dos anos 90, isolaram-se dois genes associados aos tipos de câncer citados acima: BRCA1 e BRCA2. Em cerca de 70% das famílias com quatro ou mais indivíduos afetados, mutações em um desses dois genes é detectada (Moreira-Filho e Verjovsky-Almeida, 2000). Embora a hereditariedade seja responsável por cerca de 5 a 10% do total de casos, mulheres com história familiar de câncer de mama, e portadoras da mutação no gene BRCA apresentam 80% de risco de desenvolver a doença (Gulati *et al.*, 2007). Para esse tipo de câncer, a exposição a radiações ionizantes em idade inferior aos 35 anos é um sério fator de risco (INCA, 2007).

Existe uma preocupação crescente que indivíduos portadores de mutação nos genes BRCA tenham uma resposta celular alterada por radiação (Barwell *et al.*, 2007). Há, portanto, um compromisso entre a diminuição da morbidade pela descoberta precoce de um tumor, e o seu aumento devido à potencial indução do câncer pela radiação (Bennett, 1999).

As proteínas BRCA são proteínas nucleares nas células normais. Entre as famílias com manifestação precoce e múltiplos casos de câncer de mama, os genes BRCA1 e BRCA2 contribuem com aproximadamente 50% e 30%, respectivamente, das mutações gênicas. As mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 estão presentes em 80% e 14%, respectivamente, das famílias com indivíduos portadores de câncer de mama e de ovário (Pasternak, 2002).

Os genes BRCA1 e BRCA2 agem como fatores de transcrição e participam do reparo de dano ao DNA (Pasternak, 2002). Por este motivo, portadores de mutações nos genes citados

podem ser mais sensíveis a radiações ionizantes. O desenvolvimento de tumor de mama em portadores de mutação nos genes BRCA1 e BRCA2 está associado à inativação do alelo (forma alternativa do gene) e tem levado à classificação destes genes como supressores de tumor (Biggs e Bradley, 1998). Mulheres que herdaram uma mutação nos genes BRCA1 ou BRCA2 podem ter um risco elevado de dano no DNA induzido por radiação (Broeks *et al.*, 2007).

Existe uma preocupação de que a exposição às radiações ionizantes possa aumentar o risco de câncer de mama em mulheres jovens portadoras de mutação nesses genes (Andrieu *et al.*, 2006). O risco é maior em portadoras com menos de 40 anos, particularmente aquelas que foram expostas à radiação antes dos 20 anos de idade (Levy-Lahad e Friedman, 2007).

O benefício absoluto da mamografia será menor para mulheres mais jovens do que para as mais velhas, pois a taxa de eficácia do exame e a incidência de câncer de mama em mulheres mais jovens são menores (Berrington de González *et al.*, 2009). Neste caso, o benefício do exame antes dos quarenta anos pode não compensar o risco decorrente da radiação em mulheres com histórico familiar de câncer de mama (Moss *et al.*, 2006). Para estas mulheres, o exame mamográfico é menos efetivo porque mulheres mais jovens possuem mamas mais densas, com mais tecido glandular (que é mais radiosensível) (Goldfrank *et al.*, 2006). Os exames necessitam doses maiores de raios X, além de, nesta faixa etária, os tumores crescerem mais rapidamente (Berrington de González e Reeves, 2005). Entretanto, o INCA recomenda a mulheres que tenham câncer de mama na família realizar o exame a partir dos 35 anos de idade.

A literatura não mostra experimentos com resultados definitivos que confirmem todas as afirmações acima. Existem estudos epidemiológicos, em sua maioria baseados em questionários e que não apresentam dados quantitativamente confiáveis (Gronwald *et al.*, 2008). Questionários dependem da memória das pacientes para responder corretamente sobre a idade em que foram submetidas à primeira mamografia, quantas vezes fizeram o exame e o histórico de exames de raios X em suas vidas. Normalmente elas respondem apenas o que lembram ou o que estão dispostas a informar. Várias abordagens têm sido utilizadas para compreender as interações entre os genes e as radiações (e.g. estudos epidemiológicos e estudos *in vitro* almejando descrever o mecanismo de reparo do gene). Estas investigações podem levar a uma identificação dos *loci* (posições de um gene no cromossomo) humanos que predis põem ou protegem

indivíduos da indução ao câncer de mama e facilitar as estratégias subsequentes para a detecção e tratamento de câncer de origem genética (Bertwistle e Ashworth, 1998).

A definição de um nível de radiação de menor risco para este grupo radiosensível terá implicações tanto nos exames para diagnóstico e acompanhamento das pacientes, quanto para estratégias de tratamento (Nyström *et al.*, 2002).

Este trabalho, partindo das bases teóricas encontradas na literatura sobre radiação ionizante e mutação no gene BRCA, e utilizando experimentação *in vitro* com células de paciente portadora de mutação no gene BRCA busca determinar o nível de radiação equivalente recebido durante exames mamográficos que é capaz de promover mutação detectável nas células. Esta abordagem de avaliação quantitativa do comportamento de células específicas submetidas à radiação do mamógrafo não foi encontrada na literatura, o que reforça o interesse na sua realização.

1.1 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é encontrar experimentalmente o nível de radiação da mamografia que poderia provocar uma segunda mutação nos genes BRCA, em células de pessoas com uma predisposição genética. A hipótese é que, a partir de certo nível de radiação a ser determinado, as células sofram mutação e se multipliquem desordenadamente, que é o princípio de um tumor (Borges-Osório, 2001).

Capítulo 2. Câncer de Mama,

BRCA e Mamografia

2.1 CÂNCER DE MAMA

NOS países desenvolvidos, aproximadamente 2% das mulheres que vivem até os cinquenta anos de idade e cerca de 10% daquelas que chegam aos oitenta anos sofrem a angústia do câncer de mama (Pasternak, 2002).

A Organização Mundial da Saúde estima que ocorram mais de 1.050.000 novos casos de câncer de mama por ano no mundo todo. O câncer de mama constitui-se na primeira causa de morte entre as mulheres. É provavelmente o mais temido pelas mulheres, em função de sua alta frequência e, sobretudo, de seus efeitos psicológicos, que afetam a percepção da sexualidade e a própria imagem pessoal (Bifulco *et al.*, 2010).

A mama feminina humana é uma glândula secretora grande. Durante a lactação, grupos de lóbulos semelhantes a um cacho de uva (glândulas mamárias) produzem o leite que preenche e aumenta o sistema de dutos multiramificados (Borges-Osório, 2001).

Aproximadamente 90% de todos os casos de câncer de mama são originários das células epiteliais dos dutos secretores. Inicialmente, os tumores de mama se formam nos dutos, embora posteriormente algumas células cancerosas deixem a porção interna do duto e formem massas celulares na porção externa do epitélio do duto. Os sítios secundários de invasão pelas metástases do tumor de mama compreendem a parede torácica, pulmões, fígado, cérebro, ossos e outros locais (Pasternak, 2002).

2.2 FATORES DE RISCO

A história familiar é um importante fator de risco para o câncer de mama, especialmente se um ou mais parentes de primeiro grau (mãe ou irmã) foram acometidas antes dos 50 anos de idade. Entretanto, o câncer de mama de caráter familiar corresponde a aproximadamente 10% do total de casos de cânceres de mama (Pasternak, 2002).

A idade constitui outro importante fator de risco, havendo um aumento rápido da incidência com o aumento da idade. A menarca precoce (idade da primeira menstruação), a menopausa tardia (após os 50 anos de idade), a ocorrência da primeira gravidez após os 30 anos e a nuliparidade (não ter tido filhos), constituem também fatores de risco para o câncer de mama (Thompson *et al.*, 1993).

Ainda é controversa a associação do uso de contraceptivos orais com o aumento do risco para o câncer de mama, apontando para certos subgrupos de mulheres como as que usaram contraceptivos orais de dosagens elevadas de estrogênio, as que fizeram uso da medicação por longo período e as que usaram anticoncepcional em idade precoce, antes da primeira gravidez (Bifulco *et al.*, 2010).

A ingestão regular de álcool, mesmo que em quantidade moderada, é identificada como fator de risco para o câncer de mama, assim como a exposição a radiações ionizantes em idade inferior a 35 anos (Bifulco *et al.*, 2010). Dentre os carcinógenos, os que causam o maior número de mortes nas sociedades atuais (cerca de um quarto de todas as mortes por câncer) são os da fumaça de cigarros (Guyton e Hall, 1996).

Radiações ionizantes como os raios X, raios gama e radiação de partículas de substâncias radioativas, e até mesmo a luz ultravioleta podem predispor ao câncer. Os íons formados nas células teciduais sob influência dessas radiações são muito reativos e podem romper os filamentos de DNA, produzindo por isso, muitas mutações (Pasternak, 2002).

2.3 EXAMES DE DIAGNÓSTICO

O diagnóstico precoce é o fator mais importante para salvar mulheres do câncer de mama. Os métodos atuais mais usados de rastreamento para o câncer de mama incluem mamografia, ultrassonografia, exame clínico e de ressonância magnética (MRI) (Lane, 1998). Atualmente, a mamografia é a modalidade de imagem mais amplamente utilizada (Bennett, 1999). Novas estratégias de rastreamento vêm sendo estudadas, porém até o momento a mamografia anual é indicada para mulheres a partir dos quarenta anos de idade como método efetivo para a detecção precoce (INCA, 2007), exame este garantido por lei no Brasil (Bifulco *et al.*, 2010). O exame clínico da mama deve ser realizado anualmente em todas as mulheres que procuram o serviço de saúde, independentemente da sua faixa etária (Varella, 2009).

A sensibilidade da mamografia varia entre 46 a 88% e depende de fatores como: tamanho e localização da lesão, densidade do tecido mamário (mulheres mais jovens apresentam mamas mais densas), qualidade dos recursos técnicos e habilidade de interpretação do radiologista. As mamas mais densas reduzem a capacidade da mamografia de detectar com maior exatidão um câncer de mama (Faulkner, 2007), e os exames têm, portanto, quase duas vezes mais probabilidade de resultarem em falso positivo do que mamas que possuem mais tecido adiposo, como é o caso nas mulheres com mais de 50 anos (Eisinger, 2005; Lehman, 1999).

Alguns estudos têm analisado a modificação deste método de imagem e frequência da mamografia com base no risco absoluto de vida e estado de portadores de mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 (Benson, 2006). Não é fácil determinar com exatidão e simplicidade as desvantagens e/ou os riscos de um determinado tipo de exame de diagnóstico (Black *et al.*, 2002; Juffs e Tannock, 2002).

2.4 BRCA E RADIAÇÃO IONIZANTE: RISCOS E DANOS

Foi estabelecido em estudos recentes que altas doses de radiação ionizante são um fator de risco e podem claramente produzir consequências deletérias em humanos, incluindo a indução ao câncer (Ma *et al.*, 2008).

Em doses de radiação baixas, como da mamografia, a situação é bem menos clara. O conhecimento dos riscos da radiação de baixa dose é de grande importância para a sociedade, principalmente em relação a questões como segurança nos exames de diagnóstico para o câncer (Brenner *et al.*, 2003).

Algumas subpopulações geneticamente radiosensíveis foram identificadas, tais como indivíduos com mutações nos genes BRCA, embora a relação de sensibilidade com a indução ao câncer devido à radiação ionizante seja um assunto controverso (Brenner *et al.*, 2003). Todavia não se obtiveram dados da frequência e hipersensibilidade necessários para estabelecer a relação dose resposta. É o que dizem cientistas do centro de pesquisa radiológica da Columbia University, em um trabalho em conjunto com cientistas de Oxford, Harvard e da fundação de pesquisa em efeitos da radiação em Hiroshima.

Várias abordagens estão sendo utilizadas para a compreensão das interações gene/radiação, incluindo estudos epidemiológicos, o desenvolvimento e o uso de modelos de animais e estudos em células de animais (Bennett, 1999).

Ainda que as funções dos genes BRCA1 e BRCA2 não sejam totalmente esclarecidas, foi reconhecido que ambos os genes interagem com a proteína RAD51 (Rahman e Stratton, 1999) e que esta proteína pode estar envolvida na recombinação meiótica e mitótica, bem como em vários mecanismos de reparo de danos do DNA (Chen *et al.*, 1999; Patel *et al.*, 1998).

Exposição à radiação ionizante pode causar uma variedade de tipos de danos ao DNA, dos quais os mais graves são as quebras da cadeia da dupla hélice. Quando não reparadas, estas quebras podem resultar na perda de material genético (Bernstein *et al.*, 2006). Quando incorretamente reparadas, as quebras da cadeia dupla podem resultar em danos que vão desde mutações no local da lesão original até grandes rearranjos genômicos. Os resultados das mutações aumentam o risco de câncer de mama (Thompson e Easton, 2004).

A exposição a radiações ionizantes ativa a proteína ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutado) que fosforila uma ampla gama de substratos, incluindo o BRCA1 (fosforilação é um dos principais participantes nos mecanismos de regulação das proteínas) (Bernstein *et al.*, 2006). A proteína ATM tem função de quinase (catalisar a reação de fosforilação) e esta interage com as proteínas do ciclo celular como BRCA1, com as proteínas de checagem e a proteína de reparo do

DNA (Pasternak, 2002). O gene ATM aumenta sua expressão como resposta de dano ao DNA causado por radiação ionizante, com a função de interrupção do ciclo celular. Ou seja, a exposição à radiação ionizante ativa a proteína ATM, que interage com o gene BRCA1 para interromper um ciclo celular com danos (Kastan *et al.*, 2001).

Se o gene BRCA1 é mutado ou defeituoso, poderá não haver interrupção de um ciclo celular descontrolado. Neste caso pode ocorrer mudança na padronização do crescimento de determinadas células, levando a um crescimento desordenado que pode ocasionar um câncer de mama (Bakkenist e Kastan, 2003).

Mutações dos genes BRCA poderiam não só modular a sensibilidade e especificidade da mamografia, mas também a sensibilidade dos tecidos à radiação, que pode ter implicações para as aplicações de diagnóstico e radioterapia (Benson, 2006).

A resposta a doses de radiação baixas ou altas associadas a exames de diagnóstico como a mamografia são diferentes para mulheres com alto risco de desenvolvimento de câncer de mama, e a população em geral (Bennett, 1999). O risco para o desenvolvimento de câncer de mama nestas mulheres foi determinado ser tão alto quanto 85% (Bennet, 1999).

As mulheres com uma mutação no gene BRCA1 ou BRCA2 têm riscos aumentados de câncer de mama e câncer de ovário (Narod *et al.*, 2006). Por esta razão, alguns pesquisadores recomendam que exames de diagnóstico anuais devem ter início mais cedo, por volta dos 25 anos de idade, mas o exame escolhido não necessariamente tem de ser a mamografia (Moller *et al.*, 1999).

Os dados experimentais do trabalho de Young e Burch (2000) sugerem que cada unidade de baixa dose de raios X em 1 exame da mamografia seja aproximadamente 2-6 vezes mais eficaz na indução de danos causados por mutação do que raios X de alta energia. Além disso, outro estudo constatou que a quebra de cadeia dupla no DNA em culturas de fibroblastos humanos induzida por altas doses de radiação foram eficientemente reparadas, enquanto aquelas induzidos por baixas doses de radiação (~1 mGy) não foram reparadas por muitos dias, sugerindo que a habilidade de reparo no DNA com estas doses menores de radiação pode não ser tão previsível como se acreditava (Narod *et al.*, 2006).

Dados de experimentos com camundongos sugerem uma associação entre hipersensibilidade, irradiação e mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 (Benson, 2006). Células embrionárias de ratos com uma deleção funcional no gene BRCA2 têm a capacidade de recuperação de danos causados pela exposição à radiação prejudicada. Portanto, a mamografia realizada periodicamente desde jovem (menos de 30 anos) pode representar um risco desproporcionalmente maior de indução de tumores em portadores de mutações BRCA1 e BRCA2 em comparação com aqueles sem tais mutações (Benson, 2006).

No trabalho de Narod *et al.* (2006) foram identificados 1.600 casos de câncer de mama e 1.600 casos controle sem câncer de mama, que foram agrupados por mutação nos genes BRCA, data de nascimento, e do país de residência de um registro internacional de portadores da mutação BRCA1 e BRCA2. Foi utilizado um questionário para obter informações sobre as participantes, se estas haviam feito algum exame de mamografia ou outros exames de raios X; em caso afirmativo, a idade em que o fizeram pela primeira vez e a frequência. Apesar de ser um trabalho bastante conhecido e citado na literatura, este projeto tem algumas limitações, como depender da memória das participantes e muitos dos dados terem sido levantados a partir de questionários e entrevistas telefônicas. No entanto, este é um dos estudos mais citados nesta área de pesquisa (Benson, 2006).

Estudos que extrapolaram doses de radiação usando métodos lineares sugerem que o risco deve ser muito pequeno. Por outro lado, argumentou-se que estes modelos lineares subestimam a quantidade de dano ao DNA com baixas doses de radiação e que esses modelos não prevêm adequadamente o risco de câncer de baixas doses de radiação (Ma *et al.*, 2008).

Atualmente os dados epidemiológicos sobre o risco de câncer de mama associado à exposição a doses baixas de radiação ionizante nos exames e procedimentos médicos comumente realizados, são limitados (Ma *et al.*, 2008).

Evidências epidemiológicas complementares para uma associação entre exposição à radiação em mamografias comuns de baixa dose e câncer de mama vêm de um estudo com mulheres predominantemente na pré-menopausa, com idades ≤ 40 anos, diagnosticadas entre 1983 e 1987 (Ma *et al.*, 2008). Concluiu-se que a exposição à radiação ionizante dos exames antes da idade de 20 anos foi associada a um risco elevado de câncer de mama (Hill *et al.*, 2002).

Outro estudo investiga a relação custo/benefício da ressonância magnética para mulheres mais jovens com uma mutação no gene BRCA1 (Norman *et al.*, 2007).

O NICE (*National Institute for Health and Clinical Excellence*) no Reino Unido, considerando o exame de diagnóstico da mama em mulheres com história familiar, emitiu uma orientação clínica na qual recomenda a utilização da ressonância magnética para mulheres com histórico familiar de câncer de mama, para diferentes grupos etários e para diferentes graus de risco (Faulkner, 2007).

Capítulo 3. Fundamentos Teóricos

3.1 RADIAÇÕES

RADIAÇÕES são ondas eletromagnéticas que se propagam com uma determinada velocidade. Contêm energia, carga elétrica e magnética. Podem ser geradas por fontes naturais ou por dispositivos construídos pelo homem. Possuem energia variável desde valores pequenos até muito elevados (Hayt Jr., 1978).

Luz visível, ondas de rádio e raios X são diferentes tipos de radiação eletromagnética (EM). Radiação EM não possui massa, não é afetada por campos magnéticos ou elétricos e tem uma velocidade constante em um determinado meio de propagação (Bushberg *et al.*, 2002). Radiação EM é caracterizada por comprimento de onda (λ), frequência (ν), e energia por fóton (E). Categorias de ondas EM (incluindo as ondas de rádio, TV, microondas; infravermelho, luz visível, ultravioleta; raios X e raios gama) compõem o espectro eletromagnético (Bushberg *et al.*, 2002).

Max Planck sugeriu a hipótese da energia quantizada, em que a energia de uma onda EM de frequência ν não pode ter um valor qualquer, mas apenas múltiplos inteiros de uma energia mínima ($E = h \cdot \nu$, onde $h = 6,625 \cdot 10^{-34}$ J·s), denominada *quantum* de luz (Bitelli, 2006). Os *quanta*, também chamados fótons, são pacotes de energia com propriedades semelhantes às de um corpúsculo que se move no vácuo com a velocidade da luz nos processos de emissão e absorção de energia. Cargas aceleradas emitem radiação EM (Jackson, 1999).

3.1.1 IONIZAÇÃO

Os elétrons encontram-se ligados aos átomos com certa energia devido à atração coulombiana entre cargas opostas. Ionização é o processo em que um desses elétrons absorveu tanta energia do fluxo de radiação incidente que a sua energia individual superou a energia eletrostática de ligação que havia entre ele e o núcleo atômico. Quando isso acontece, o elétron é

ejetado – liberado – para fora do átomo, que fica ionizado. Este elétron muito energético deverá sofrer diversas colisões até que seja parado e realocado em algum átomo do meio. No entanto, enquanto tiver energia suficiente nas colisões, poderá provocar a quebra de diversas outras ligações químicas, com a consequente ejeção de vários outros elétrons e a formação de novos íons (Biral, 2002).

3.1.2 RADIAÇÕES IONIZANTES

Definiu-se como radiação ionizante toda e qualquer radiação com comprimento de onda menor que 1.000 \AA , que corresponde a uma energia acima de 12,4 eV (Biral, 2002). A partir desta energia, a maior parte dos átomos ou moléculas simples pode ter seus elétrons mais externos arrancados ao serem atingidos por esta radiação. Essa é aproximadamente a energia de ionização da molécula de água, principal constituinte do meio celular.

3.2 PROCESSOS DE PRODUÇÃO DOS RAIOS X

Raios X são produzidos quando elétrons muito energéticos interagem com a matéria e convertem energia cinética em radiação EM. Esta conversão pode ser realizada de forma controlada dentro de dispositivos chamados tubos (ou ampolas) de raios X. Os tubos contêm um catodo (liberador de elétrons) e um anodo (alvo dos elétrons) no vácuo, e uma fonte de energia elétrica externa para acelerar os elétrons do catodo em direção ao anodo.

Ao se chocarem com os átomos do anodo, os elétrons liberam sua energia cinética na forma de fótons (radiação eletromagnética) de comprimento de onda característica, dependente do material do anodo. Estes fótons atravessam o tubo de raios X, são colimados e constituem o feixe de raios X (Bushberg *et al.*, 2002).

3.2.1 RADIAÇÃO CARACTERÍSTICA

Sabe-se hoje que as emissões de fótons característicos são processos naturais que permitem a liberação de excesso de energia de um átomo durante a transição de elétrons para suas camadas mais internas. Uma única transição pode provocar outras transições de elétrons em cascata, com a emissão de fótons característicos de uma faixa de energia.

A interação entre elétrons pode ser provocada e resultar na ejeção de elétrons das camadas mais próximas ao núcleo (K, L, ...) e na emissão de fótons característicos ou raios X característicos com energia igual à diferença das energias de ligação das camadas K, L, M ... do elemento (Figura 1). O processo de ionização é uma das formas de gerar fótons ou raios X característicos por meio da transformação da energia cinética dos elétrons acelerados em radiação eletromagnética. Neste caso, são denominados característicos por serem próprios do elemento químico do alvo de interação, anodo. O anodo é ligado ao pólo positivo da fonte, serve de suporte para o alvo e atua como elemento condutor de calor (Bushberg *et al.*, 2002).

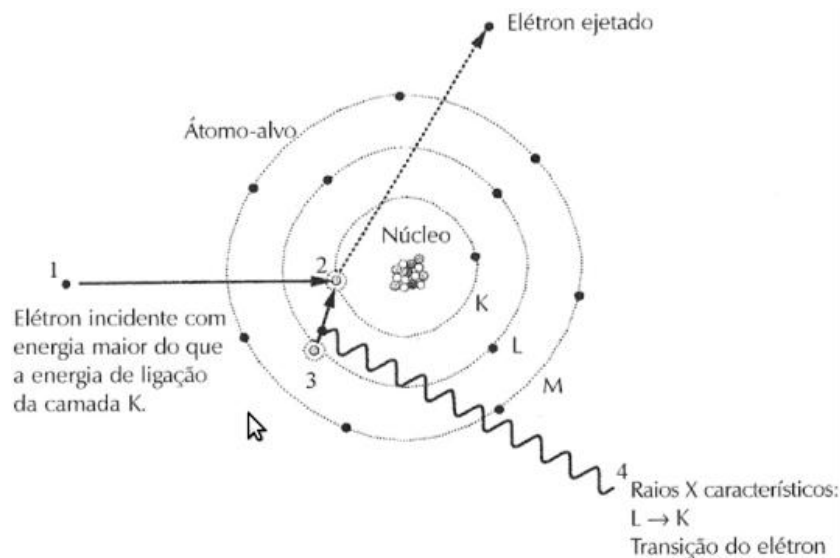


Figura 1 – Geração de raios X característicos (Bitelli, 2006).

Uma variedade de transições pode ocorrer e gerar raios X característicos com energias de camadas adjacentes ou não. No entanto, para raios X utilizados de forma convencional no radiodiagnóstico, é importante que a energia do elétron acelerado seja maior do que a energia de ligação do elétron da camada K do material do alvo. Quanto mais alta a energia do elétron incidente em relação à energia da camada K do alvo, maior será o número de fótons de raios X característicos.

No caso do molibdênio e do ródio, utilizados como alvos nos equipamentos de raios X para estudos da mama (mamógrafos) os raios X característicos são gerados somente quando

elétrons são acelerados e atingem o alvo com energia superior a 20 keV (camada K do molibdênio) e 23,2 keV (camada K do ródio) (Bitelli, 2006).

3.2.2 BREMSSTRAHLUNG

Nos equipamentos de raios X, a desaceleração de elétrons pode ocorrer principalmente no campo elétrico dos núcleos dos átomos que constituem o elemento alvo, devido à atração coulombiana. Desta forma, os elétrons convertem sua energia cinética em radiação eletromagnética (raios X) por interação com o campo nuclear (Figura 2). Este processo é chamado perda de energia por freamento ou *bremsstrahlung*, e resulta na produção de fótons de alta energia. A diferença das forças coulombianas e da energia de aceleração dos elétrons vai determinar a energia dos fótons de raios X por *bremsstrahlung*. Quanto mais próxima do núcleo for a interação com o elétron, maior será a probabilidade de emissão de fótons de alta energia. O espectro total dos fótons de raios X mostrado na Figura 3 ilustra a distribuição de possíveis energias dos fótons, entre elas as energias prováveis por radiação *bremsstrahlung* (espectro contínuo) e por radiação característica (espectro de raios), proveniente da interação do elétron com alvo de tungstênio ou outro metal.

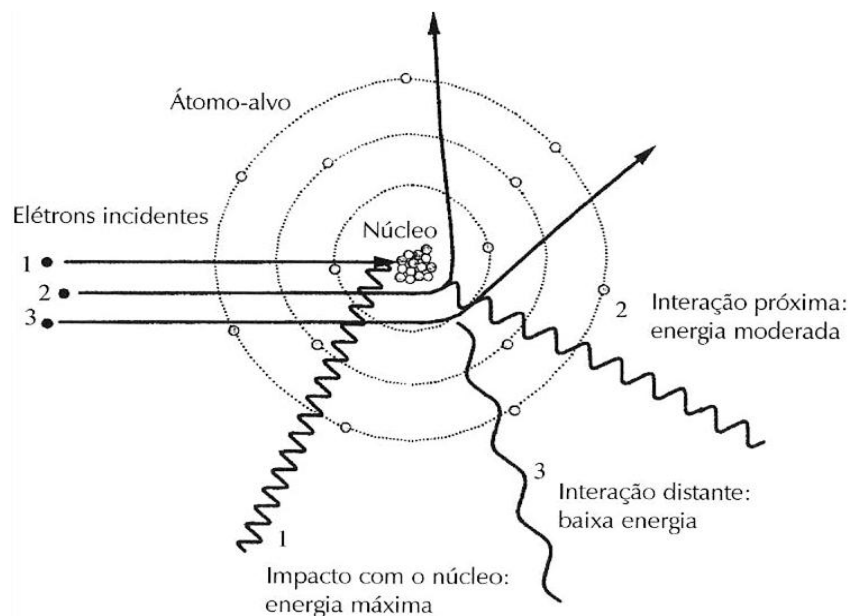


Figura 2 – Geração de raios X por *bremsstrahlung* (Bitelli, 2006).

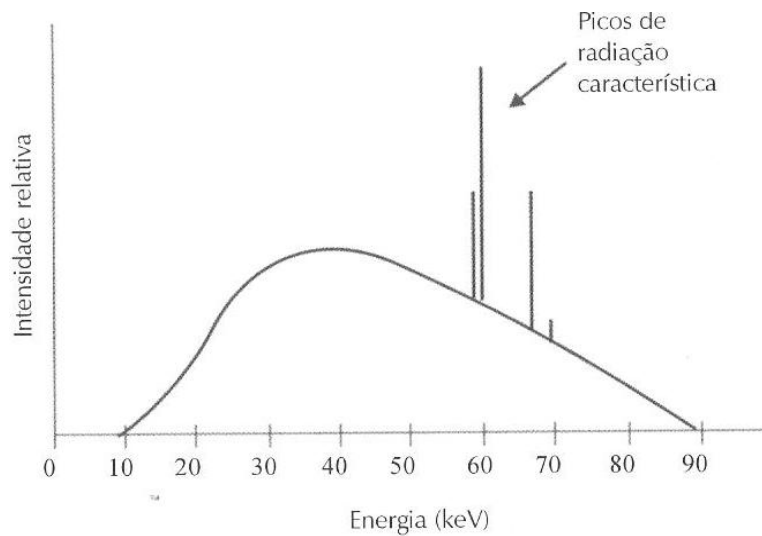


Figura 3 – Espectro total do feixe de raios X gerado com alvo de tungstênio para tensão do tubo de 90 kVp (Bitelli, 2006).

O espectro de energia dos fótons gerados em um equipamento radiológico é resultado não só de desaceleração e integração dos elétrons no alvo, mas também de como este processo é influenciado pelas características do equipamento responsável pela intensidade do feixe de raios X utilizado para fins de diagnóstico (Johns e Cunningham, 1983).

Quando um elétron é acelerado sob uma diferença de potencial V , adquire uma energia cinética $V \cdot e$, sendo e a sua carga elétrica, que vale $1,6 \cdot 10^{-19}$ coulombs. Ao incidir em um alvo, essa energia é principalmente transferida aos átomos e elétrons constituintes do elemento alvo, o que a transforma parcialmente em *quanta* de radiação X e eleva a temperatura do alvo (Biral, 2002).

3.3 FATORES QUE MODIFICAM A INTENSIDADE DO FEIXE DE RAIOS X

A intensidade de um feixe de raios X é função do número total de fótons de raios X e da energia que estes transportam. A energia dos fótons de raios X resultante da desaceleração dos elétrons dependerá da distância entre o elétron e o núcleo, da sua energia e da carga no núcleo. Assim, a intensidade do feixe de raios X produzido pelos equipamentos radiológicos depende de quatro parâmetros: material do alvo, tensão no tubo, corrente no tubo e filtração (Bitelli, 2006).

3.3.1 O TUBO DE RAIOS X

O tubo representado na Figura 4 consiste em uma ampola de vidro que contém dois eletrodos (ânodo e cátodo) dispostos de modo que os elétrons liberados pelo efeito térmico no cátodo possam ser acelerados por uma diferença de potencial fornecida por um gerador de alta tensão. À medida que ocorre o choque dos elétrons com os átomos do elemento metálico do ânodo, estes elétrons liberam a maior parte de sua energia na forma de calor.

Para condições rotineiras de exposição em radiografia médica, apenas cerca de 1% da energia cinética dos elétrons é convertida em raios X. Para dissipar o calor gerado por estas colisões, o material do alvo deve possuir elevado ponto de fusão e alta capacidade de ceder calor, como é o caso do tungstênio. Além disso, este alvo é incrustado numa haste de cobre que contribui para a evacuação do calor para o exterior do tubo, que por sua vez é refrigerado a óleo, água ou ar (Bitelli, 2006).

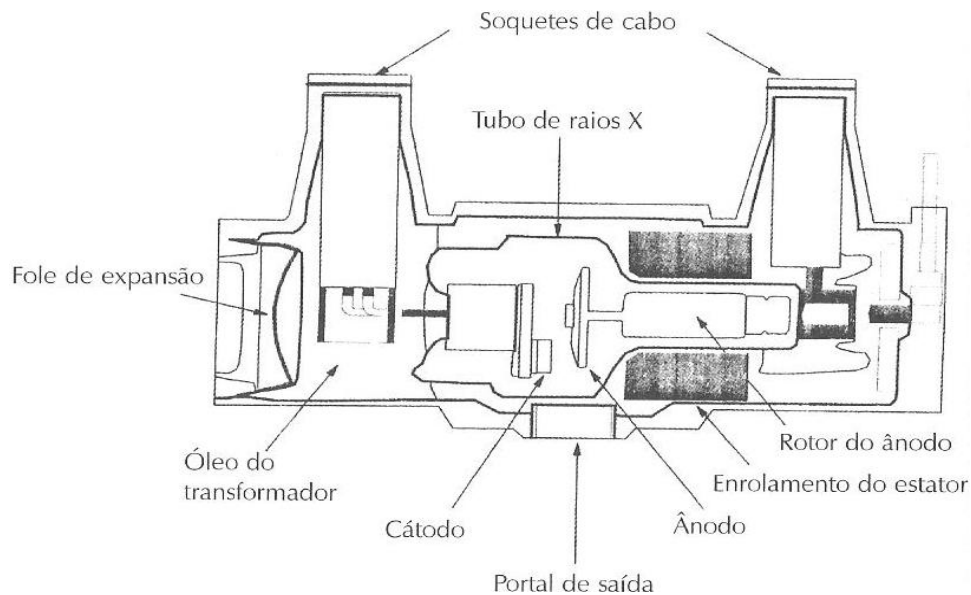


Figura 4 – Tubo de raios X e montagem da carcaça (Bitelli, 2006).

3.3.2 MATERIAL DO ALVO

Quanto maior o número atômico do elemento utilizado como alvo, maior será a probabilidade do elétron perder energia cinética por radiação *bremsstrahlung*, proporcionando mais intensidade de fótons de raios X devido ao maior número de fótons produzidos.

O número atômico do alvo também determina a qualidade dos fótons produzidos a partir das interações dos elétrons por colisões. Por exemplo, para o tungstênio ($Z = 74$), além de fótons característicos de 59 keV, são gerados fótons de cerca de 9 keV, correspondentes à diferença das energias de ligação das camadas L (11,5 keV) e M (2,5 keV) (Bitelli, 2006).

3.3.3 TENSÃO NO TUBO (kVp)

A tensão de pico no tubo (kVp) determina a energia máxima no espectro *bremsstrahlung*, afeta a qualidade da saída do espectro e a eficiência da produção de raios X. Um aumento de kVp aumenta a eficiência da produção dos raios X e da quantidade e qualidade dos feixes de raios X.

Exposição é aproximadamente proporcional ao quadrado da tensão no tubo na faixa de energia de diagnóstico: Exposição \propto (kVp)².

Mudanças na tensão (kVp) devem ser compensadas por mudanças correspondentes na corrente-tempo (mAs) para manter a mesma exposição (Johns e Cunningham, 1983).

3.3.4 CORRENTE NO TUBO (mA)

A corrente do tubo (mA) é igual ao número de elétrons fluindo do catodo para o anodo por unidade de tempo. A exposição do feixe para um dado kVp e para uma dada filtração é proporcional à corrente do tubo de raios-X (Bushberg *et al.*, 2002).

A corrente do tubo é controlada pelo grau de aquecimento do filamento (catodo). Quanto mais aquecido for o filamento, mais elétrons serão emitidos pelo mesmo, e maior será a corrente que fluirá entre anodo e catodo. Assim, a corrente de filamento controla a corrente entre anodo e catodo (Johns e Cunningham, 1983).

3.3.5 FILTRAÇÃO

Filtros modificam o espectro da radiação quando adicionados na saída do feixe de raios X, e portanto modificam também a intensidade da radiação (Mendoza, 2010). Filtros de alumínio ($Z = 13$) e de cobre ($Z = 29$) geralmente são utilizados em equipamentos convencionais, com o objetivo de absorver os fótons de menor energia presentes no feixe de raios X e que são absorvidos na superfície da pele. O cobre é geralmente usado em combinação com o alumínio

como filtro composto para absorção dos fótons de maior energia. A filtração ocorre principalmente no cobre. O alumínio é utilizado para absorver a radiação característica (de aproximadamente 8 kV) produzida pela interação dos fótons no cobre que, se não fossem atenuados, aumentariam significativamente a dose na pele do paciente. Já a radiação característica produzida no alumínio de 1,5 keV é absorvida no ar existente entre paciente e filtro. Este processo é comumente utilizado para “endurecer” o feixe, aumentando a sua energia média e, portanto, a sua penetração. Além dos filtros metálicos, fótons de baixa energia são filtrados pelo vidro existente na janela por onde emerge o feixe útil de raios X, e pelo óleo utilizado no resfriamento da ampola. Esta filtração inerente é medida em espessura equivalente de alumínio, usualmente entre 0,5 e 1,0 mm de Al equivalente, sendo o vidro o maior responsável pela filtragem.

A intensidade de radiação X produzida não é linearmente proporcional à tensão de aceleração dos elétrons (kVp), mas proporcional ao quadrado ou até ao cubo dessa tensão, uma vez que o efeito da filtração sobre os fótons gerados com energia mais baixa é proporcionalmente maior. Dessa forma, para tensões altas, a intensidade pode aumentar aproximadamente com o cubo da tensão aplicada no tubo.

A taxa de dose de um feixe de raios X não é prontamente calculável devido às características de espectro do feixe, decorrente da conversão da energia cinética em radiação eletromagnética. Além disso, a filtração pode variar e modificar estas características (Shapiro, 1990). A filtração do feixe modifica a quantidade e qualidade do feixe de raios X removendo seletivamente fótons de baixa energia. Isto reduz o número de fótons e desloca a energia média para valores mais altos, aumentando a qualidade (Bushberg *et al.*, 2002).

3.3.6 ATENUAÇÃO DOS FEIXES DE RAIOS X

A quantidade de radiação atenuada para uma dada espessura do absorvedor é medida pelo coeficiente de atenuação linear ou coeficiente de absorção de massa, específico para a energia dos fótons que constituem o feixe e o tipo de material absorvedor. À medida que a energia do feixe aumenta, menos fótons são absorvidos por uma mesma espessura do meio atenuador (Bitelli, 2006). No caso da preparação com células *in vitro* utilizada neste trabalho, a

espessura do meio celular é praticamente zero, assim como sua massa.

3.3.7 GERADORES

Os tubos de raios X necessitam baixa tensão para alimentar o filamento do catodo, e alta tensão para o anodo. Ambas são providas pelo gerador, que também possui um circuito para controlar o tempo de exposição (temporizador), instalado no comando do equipamento.

Os diferentes níveis de tensão são obtidos por transformadores e circuitos retificadores, que podem ser monofásicos, trifásicos, de alta e média frequência, e ainda de meia onda ou onda completa (Johns e Cunningham, 1983).

3.4 MAMOGRAFIA

A mamografia é um exame radiográfico destinado a detectar patologias na mama. Fornece informações sobre morfologia, anatomia e patologias gerais da mama por meio de imagens radiográficas (mamograma). A mamografia é principalmente utilizada na detecção e diagnóstico do câncer de mama, como também para avaliar massas, palpáveis ou não, de lesões.

Deve ser realizada a cada dois anos em mulheres entre 50 e 69 anos, ou segundo recomendação médica. É realizada em um aparelho de raios X dedicado, chamado mamógrafo. Nele a mama é comprimida de forma a fornecer melhores imagens, e, portanto, melhor capacidade de diagnóstico (INCA, 2007).

3.4.1 QUALIDADE DA IMAGEM MAMOGRÁFICA

A qualidade da imagem de um exame radiográfico, relacionada à informação contida no exame, está diretamente ligada à quantidade de radiação ionizante que é emitida do equipamento radiológico. Portanto existe um compromisso entre qualidade do exame radiológico e quantidade de radiação ionizante. Se for necessário diminuir a quantidade de radiação emitida pelo equipamento radiológico por motivo de segurança do paciente, se faz necessário um estudo da qualidade da imagem, para que se tenha o conhecimento do limiar entre uma imagem satisfatória para detectar anomalias em um exame diagnóstico, e um nível mais seguro de radiação ao paciente.

A garantia de qualidade é essencial na mamografia, tanto para programas de rastreamento quanto para o diagnóstico. Para isso, o exame deve ser planejado na geração da imagem para que a qualidade do diagnóstico seja boa o suficiente, mas com um menor risco para a paciente. O nível de radiação ionizante necessário para visualizar uma massa grande em mama gordurosa pode não ser a mesma daquela que pretende mostrar microcalcificações em tecido glandular denso. O sucesso da mamografia depende da produção de imagens de alta qualidade e de baixa dose, que resultarão no aumento da detecção precoce do câncer, confiança no método e redução do número de exames desnecessários.

3.4.2 CONSIDERAÇÕES TÉCNICAS

A mamografia é um exame radiológico com particularidades e limitações físicas inerentes ao processo de obtenção de imagem. Quando energia mais baixa é utilizada, o tecido adiposo e o parênquima mamário têm coeficientes de atenuação que variam por um fator de 2, e o contraste da imagem é melhorado (Bitelli, 2006). Regiões de contraste pobre devido a pequenas diferenças de atenuação podem dificultar a detecção de estruturas na mama densa, uma vez que neste caso é necessário utilizar energia mais baixa. Para minimizar perdas de detecção, faz-se uma adequação do espectro dos raios X às mamas densas por meio da seleção do alvo (anodo) e filtro no ponto de geração dos raios X.

3.5 PARÂMETROS FÍSICOS

3.5.1 QUALIDADE DA RADIAÇÃO

Os mamógrafos atuais possibilitam usar diferentes conjuntos de alvo e filtro (ex.: molibdênio e ródio; ródio e ródio) que modificam o espectro da radiação (Bitelli, 2006).

Em mamografia são utilizadas técnicas de baixa tensão para garantir que as interações fotoelétricas produzam o contraste anatômico desejado. Para tal, o tubo deve possuir alvo de molibdênio ou de ródio para a produção de raios X característicos entre 15 e 22 keV (Bitelli, 2006). As interações em uma região do corpo dependem dessa energia dos fótons (qualidade da radiação), além do número atômico efetivo (a absorção varia com Z^3 para energias baixas) e da densidade do tecido (números de elétrons existentes na espessura correspondente à área do

tecido irradiado). A Tabela I apresenta alguns desses valores.

Tabela I – Propriedades físicas de alguns elementos que compõem os tecidos (Bitelli, 2006).

<i>Meio</i>	<i>Número atômico (Z)</i>	<i>Densidade (g/cm³)</i>	<i>Número de elétrons/kg</i>
Ar	7,6	1,29	$3,01 \cdot 10^{26}$
Água	7,4	1	$3,34 \cdot 10^{26}$
Tecido Leve	7,4	1	$3,36 \cdot 10^{26}$
Gordura	5,9 a 6,3	0,93	$3,34 \text{ a } 3,48 \cdot 10^{26}$
Osso	11,6 a 13,8	1,65 a 1,85	$3,00 \text{ a } 3,19 \cdot 10^{26}$

As densidades dos tecidos fibroglandular ($1,04 \text{ g/cm}^3$) e adiposo ($0,9 \text{ g/cm}^3$) refletem a diferença de absorção e espalhamento dos fótons que dependem da energia efetiva do feixe de raios X. A Figura 5 mostra as pequenas diferenças de atenuação linear (cm^{-1}) para diferentes energias dos fótons. Como pode ser observado, a diferença torna-se sutil com o aumento da energia efetiva do feixe (Tabela II).

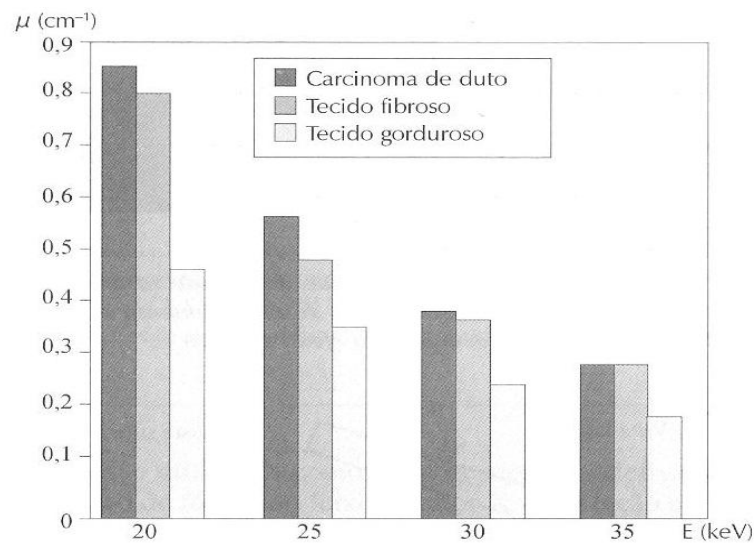


Figura 5 – Diferenças de atenuação dos raios X em função da energia dos fótons para diferentes tecidos que podem estar presentes na imagem mamográfica (Bitelli, 2006).

Tabela II – Coeficientes de absorção de massa para diferentes tecidos em função da energia ou qualidade da radiação utilizada nos exames mamográficos (em m²/kg – Bitelli, 2006).

<i>keV</i>	<i>Ar</i>	<i>Água</i>	<i>Osso</i>	<i>Músculo</i>
10	0,466	0,489	1,900	0,496
20	0,052	0,052	0,251	0,054
30	0,015	0,015	0,074	0,015

3.6 DESEMPENHO DO SISTEMA MAMOGRÁFICO

Neste trabalho procurou-se quantificar o nível de radiação que seria menos arriscado para a mulher, mas que ainda forneça um exame de qualidade. Por isso é importante conhecer os parâmetros de qualidade necessários a um bom exame.

São quatro os parâmetros físicos que devem ser considerados na avaliação da qualidade da imagem mamográfica: contraste, nitidez ou definição, dose e ruído. A interdependência destes fatores pode alterar a qualidade da imagem. O valor da dose da mamografia está diretamente relacionado a estes fatores, e é por isto que não se pode simplesmente diminuir a dose da mamografia, porque neste caso, os fatores técnicos da qualidade da mamografia não estariam sendo considerados, a qualidade poderia ficar prejudicada e o risco da radiação não compensaria a informação do exame mamográfico.

A dose glandular média é o índice utilizado para avaliação das doses de radiação. Há muitas variáveis na determinação da dose e por isso considerou-se a redução de contraste o parâmetro limitante na otimização das doses. O contraste da imagem está diretamente associado à energia da radiação e é altamente influenciado pelo espalhamento da radiação e pelos fatores técnicos de exposição. Sabe-se que a tensão (kVp) tem um efeito significativo na detecção de lesões de baixo contraste. Quanto menor a tensão, maior o contraste e maior a possibilidade de detecção.

Capítulo 4. Interação da Radiação

Ionizante com a Matéria

4.1 ABSORÇÃO DE ENERGIA

QUANDO um feixe de raios X passa através de um meio como o tecido vivo, parte da sua energia é transferida para o tecido, e essa energia pode provocar alterações biológicas (Johns e Cunningham, 1983). A energia transferida por unidade de massa do meio absorvivo é conhecida como dose absorvida, é um valor bastante útil para prever possíveis efeitos biológicos.

Alguns dos elétrons de alta velocidade (que foram postos em movimento pelos fótons) podem interagir com um núcleo e produzir radiação espalhada por *bremsstrahlung*, que por sua vez pode provocar interações da mesma forma que o fóton inicial.

A produção de elétrons de alta velocidade a partir da interação com fótons de raios X se dá por três mecanismos, que normalmente ocorrem simultaneamente: efeito fotoelétrico, espalhamento incoerente Compton, e produção de pares.

Os mecanismos de interação com a matéria e os efeitos biológicos são explicados dependendo do tipo de radiação que foi irradiada, e dos mecanismos de produção de elétrons citados acima. É através destes que se sabe mais sobre os efeitos que a ionização pode causar na matéria.

4.2 MEDIÇÃO DE RADIAÇÃO: DOSIMETRIA

Alguns conceitos referentes à dosimetria serão descritos a seguir. Deve ficar claro que não se pode medir dose em células, pois estas praticamente não possuem massa; neste caso

deve-se falar em exposição de radiação. Quando células são irradiadas, está-se fazendo uma exposição de radiação (o conceito de exposição será dado mais à frente).

Existem duas considerações diferentes em dosimetria: descrever o feixe de radiação e descrever a quantidade de energia que o feixe poderia depositar em algum meio.

4.2.1 QUANTIDADES PARA DESCREVER UM FEIXE DE RADIAÇÃO

✓ Fluência:

A radiação proveniente de um gerador de raios X ou uma fonte radioativa consiste em um feixe de fótons, normalmente com quantidades de energia diferentes. Considerando um feixe monoenergético, um meio de descrever o feixe seria especificar o número de fótons N deste feixe que atravessa a área a , em certo ângulo (Johns e Cunningham, 1983). Esta razão é o que a ICRU (*International Commission on Radiological Units*) chamou de fluência (ou fluência de fóton), representada por Φ :

$$\Phi = \frac{dN}{da} \quad (1)$$

O número de fótons que passa por uma unidade de área em uma unidade de tempo é chamada razão de fluência e é representada por ϕ :

$$\phi = \frac{d\Phi}{dt} \quad (2)$$

Uma forma alternativa para descrever o feixe é quantificar o fluxo de energia por unidade de área. Esta quantidade é chamada fluência de energia e é representada por Ψ , com h sendo a constante de Planck e ν a frequência:

$$\Psi = \frac{dN \cdot h\nu}{da} \quad (3)$$

A energia carregada através de uma unidade de área por uma unidade de tempo é a densidade de fluxo de energia ou intensidade. É representada por ψ :

$$\psi = \frac{d\Psi}{dt} \quad (4)$$

Esses conceitos são simples, mas a representação real de um feixe de radiação por qualquer um destes conceitos nem sempre é possível, porque feixes quase sempre contêm fótons de diferentes energias. Para descrever um feixe real usando essas quantidades deve-se saber o

número e a energia de todos os fótons do feixe, e esta informação não é trivial. A distribuição do número de fótons que possuem determinadas quantidades de energia é chamada espectro (Johns e Cunningham, 1983).

Como citado acima, não se deve falar em dose de radiação quando o tecido irradiado é composto por uma fina camada de células, e sim exposição, como definido a seguir.

4.3 EXPOSIÇÃO

A grandeza exposição foi concebida de modo a ser de medição relativamente simples, através da carga elétrica coletada entre duas placas metálicas sob a ação de um potencial elétrico, com ar seco entre elas (Biral, 2002). Esta grandeza, cuja unidade é o roentgen (R), foi definida pela ICRU visando a padronização da medição de uma irradiação de raios X. Ela quantifica o total de cargas elétricas produzidas em ar seco por unidade de massa.

Desse modo, conforme a definição, 1 R equivale à exposição de raios X (ou raios gama) tal que a emissão corpuscular associada (elétrons, frutos das ionizações produzidas pelos fótons de alta energia no meio) em uma massa de 0,001293 g de ar (1 cm³ de ar seco, a 0° C e a 1 atmosfera) produza uma quantidade de íons carregados e elétrons livres de 1 esu (unidade de carga elétrica padrão = $2,082 \cdot 10^9$ íons ou $3,333 \cdot 10^{-10}$ coulombs) de cada sinal. Assim, 1 R = 1 esu/cm³ de ar seco (Biral, 2002).

Uma razão importante para usar o ar como meio padrão é a sua similaridade com a composição do tecido humano. Apesar de apresentarem densidades diferentes, os números atômicos efetivos de uma mistura típica de ar e de tecido mole são muito próximos (7,75 e 7,9 respectivamente). Isto faz com que, para efeitos de produção de ionizações por unidade de massa, o número de ionizações a ser produzido seja relativamente semelhante (Biral, 2002).

A grandeza exposição é normalmente usada para medição de irradiação em células, uma vez que o cálculo de dose para células não é trivial devido à sua baixa massa (no caso de um glóbulo vermelho a massa é da ordem de $9 \cdot 10^{-14}$ kg).

Um feixe de raios X pode ser então descrito em termos de exposição (R) pela sua capacidade de ionizar o ar.

4.4 TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA: UM PROCESSO DE DOIS ESTÁGIOS – DOSE ABSORVIDA E KERMA

4.4.1 DOSE ABSORVIDA

A grandeza dose absorvida D é a quantificação da energia de um feixe de radiação ionizante absorvida por unidade de massa de um material biológico. É dada em rad ou 100 erg/g (ICRU, 1980).

$$D = \frac{d\bar{E}_{ab}}{dm} \quad (5)$$

onde $d\bar{E}_{ab}$ é a energia média transferida pela radiação ionizante à massa dm da matéria.

A dose absorvida é a energia retida no meio que é causada pelas ionizações e excitações que ocorrem ao longo do percurso do elétron nesse meio. Em 1975 foi adotada outra unidade, no sistema internacional, denominada gray (Gy) ou joule/kg:

$$1 \text{ rad} = 100 \text{ erg/g}$$

$$1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg} = 10^7 \text{ erg}/10^3 \text{ g} = 100 \text{ rad}$$

$$1 \text{ R} = 8,76 \text{ mGy}$$

4.4.2 KERMA

A transferência de energia de um feixe de fótons para um meio se dá em dois estágios. O primeiro estágio envolve a interação de um fóton com um átomo, que põe em movimento um ou mais elétrons. O segundo estágio envolve a transferência de energia de elétrons de alta energia para um meio através de excitação e ionização. A quantidade chamada Kerma (*Kinetic Energy Released in the Medium*) foi introduzida pela ICRU para descrever a interação inicial de um fóton com o átomo, pondo elétrons em movimento (Johns e Cunningham, 1983).

$$\text{Kerma} = \frac{d\bar{E}_k}{dm} \quad (6)$$

onde $d\bar{E}_k$ é a energia cinética média transferida dos fótons para os elétrons em um elemento de volume cuja massa é dm .

Kerma é um conceito útil para descrever a dosimetria da radiação. Ao invés da medição direta da energia depositada pelo feixe de fótons, mede-se a diferença entre a energia dos fótons incidentes e emergentes de uma determinada profundidade do meio considerado (Johns e Cunningham, 1983).

Kerma é, no entanto, uma grandeza teórica, que não pode ser medida diretamente, pois se refere à energia disponível para as ionizações que ainda irão ocorrer. Por exemplo, logo na interface do material o Kerma é máximo. Nesta região, um grande número de fótons do feixe de alta energia já interagiu, colocando energia nos elétrons livres que somente então começarão uma trajetória de dissipação dessa energia no meio material considerado (Biral, 2002).

4.4.3 DIFERENÇA ENTRE KERMA E DOSE ABSORVIDA

Pode-se considerar, como uma aproximação, que a parte da energia que não emergir na forma de fótons foi realmente convertida em energia cinética dos elétrons pelos processos de interação com a matéria. Isto é, a diferença entre o fluxo de fótons incidentes e emergentes em uma dada profundidade (conceito de Kerma definido acima) ficou no meio sob a forma de energia depositada (Johns e Cunningham, 1983).

Na prática, uma vez que a transferência de energia é um processo em duas etapas, haverá (especialmente) uma diferença entre os locais de transferência e de depósito de energia.

Outro aspecto a ser destacado é que nos cálculos de Kerma supõe-se que a energia transferida aos elétrons seja completamente depositada no meio, e não torne a ser irradiada sob forma de fótons (por *bremsstrahlung*). No entanto, como os números atômicos efetivos da água, do ar, ou do tecido vivo são baixos, considera-se que a fração da energia perdida por *bremsstrahlung* seria muito pequena. Nesses casos os cálculos de Kerma e dose absorvida seriam aproximadamente iguais.

4.5 O FATOR ROENTGEN-RAD

A definição de roentgen implica no uso de ar como meio a ser irradiado. Porém espera-se que o número de ionizações produzidas por fótons em tecido humano seja diferente.

Uma estimativa da energia depositada em tecido humano pode ser obtida a partir do fator chamado “fator roentgen-rad” (também chamado “fator f”), que é o coeficiente de absorção (μ_{ab}) de massa (μ_{ab}/ρ) do material dividido pelo coeficiente de absorção do ar (Tabela III).

$$\text{Fator } f = \frac{\left(\frac{\mu_{ab}}{\rho}\right)_{\text{material}}}{\left(\frac{\mu_{ab}}{\rho}\right)_{\text{ar}}} \quad (7)$$

Tabela III – Fator f para vários tecidos (NIST – *National Institute of Standards and Technology*).

<i>Energia do fóton</i>	μ_{ab}/ρ (ar) (cm ² /g)	<i>Fator f</i> (água)	<i>Fator f</i> (músculo)	<i>Fator f</i> (gordura)	<i>Fator f</i> (osso)
30 keV	0,1540	1,0130	1,0510	0,6180	6,9620
200 keV	0,0267	1,1100	1,1010	1,1070	1,1240
1,25 MeV	0,0267	1,1120	1,1020	1,1140	1,0300

Quando se trata de dose absorvida, os valores se mostrarão independentes da densidade do material considerado (Bitelli, 2006). Através do fator f pode-se notar que, sem levar em conta as diferenças de densidades, para energias de feixe de fótons de 30 keV (típicas de raios X de mamografia) o osso absorve quase 7 vezes mais energia do que o tecido humano mole. Por outro lado, para feixes de fótons com energia de 200 keV, o osso e o tecido mole apresentam absorções de energia praticamente semelhantes – embora, devido às diferentes densidades (1,92 e 1,06 g/cm³ respectivamente), a energia absorvida por uma mesma espessura de osso acabe sendo maior.

No ar, a dose absorvida por um feixe de 1 R equivale a 8,76 mGy. Para outros meios, a dose absorvida pode ser aproximada através da multiplicação do fator f pela dose absorvida no ar.

4.6 MEDIÇÕES COM CÂMARA DE IONIZAÇÃO

Em uma câmara de ionização o processo de medição para exposições e doses absorvidas parte do mesmo princípio. Primeiramente o valor de exposição correspondente é inferido através da quantidade de cargas elétricas produzidas em ar, após a passagem de um feixe de radiação ionizante. Posteriormente, a exposição medida pode ser apresentada em unidade de dose absorvida (energia por unidade de massa), através do emprego de fatores de conversão.

Uma câmara de ionização pressupõe um espaço de ar confinado entre dois eletrodos, entre os quais se encontra aplicada uma diferença de potencial de algumas centenas de volts. O feixe de radiação ionizante produz ionizações nas moléculas desse espaço de ar e o sinal elétrico produzido, que é independente da tensão elétrica aplicada entre os eletrodos e depende apenas do número de íons produzidos, fornece o valor de exposição correspondente.

A câmara de ionização pode ser pensada como um capacitor, tendo o ar como meio dielétrico. A indução de cargas elétricas no meio proporcionará uma mudança no valor da capacidade do meio que é relacionada com valores de exposição ou dose. Cuidados com relação à remoção da umidade do ar, ou da aplicação de fatores de correção para as condições normais de temperatura e pressão (0 °C e 1 atm) dependem de especificações do fabricante. Um maior volume sensível de gás na câmara proporcionará uma maior sensibilidade da mesma. Para maior precisão da medida, existem modelos específicos onde até mesmo a massa de ar do volume sensível é cuidadosamente deduzida (Biral, 2002).

Outro tipo de material que não o ar provavelmente possuirá uma energia média de ionização diferente, e um regime de deposição de energia próprio. A medição da dose pode ser feita por inferência através da aplicação de uma correção como a do fator roentgen-rad explicado acima. Porém, tal medida sempre se verá sujeita, na prática, a imprecisões (Biral, 2002).

4.7 EFEITOS BIOLÓGICOS DAS RADIAÇÕES IONIZANTES

4.7.1 RADIAÇÃO IONIZANTE: MECANISMO DE AÇÃO

A radiação ionizante pode interagir diretamente com componentes celulares como DNA, proteínas, lipídios, provocando alterações estruturais. É o chamado efeito direto e constitui cerca de 30% do efeito biológico das radiações.

Podem também interagir com o meio onde os constituintes celulares e as próprias células estão imersas, a água, produzindo radicais livres. Radicais livres são átomos com um número ímpar de elétrons, ou seja, possuem elétrons de valência desemparelhados, o que os torna altamente reativos. Neste caso tem-se o efeito indireto que corresponde a cerca de 70% do efeito

biológico produzido pelas radiações. A maior probabilidade de ocorrência do efeito indireto se deve ao fato da água ocupar parcela substancial da composição celular. Além disto, os radicais livres também podem ser produzidos devido à ionização de outros constituintes celulares, particularmente os lipídios (CNEN).

A radiação pode interagir com os átomos da matéria, arrancando elétrons. O elétron arrancado pode ser capturado por outra molécula de água. Os íons assim formados H_2O^+ e H_2O^- interagem com moléculas vizinhas e geram no balanço final radicais livres H^+ e OH^- . A recombinação dos radicais livres leva à formação de outros componentes, como o peróxido de oxigênio (H_2O_2). Quando os radicais livres reagem com moléculas orgânicas, são formados radicais livres orgânicos (Bitelli, 2006).

A presença de oxigênio induz a formação de radicais livres peroxidantes, os quais impedem a recombinação para a molécula original e levam ao aumento de radicais livres no meio, com maior potencial lesivo.

4.7.2 RESPOSTA DAS CÉLULAS À RADIAÇÃO

✓ DNA

O DNA é um dos alvos mais importantes para os efeitos citotóxicos da radiação. A quebra da dupla hélice do DNA é a mais prejudicial, podendo levar a célula à morte. Considera-se que as células apresentam, aproximadamente, a mesma quantidade de quebras duplas por gray de radiação, ou seja, se as células tiverem o mesmo dano, o que diferencia a sensibilidade ou a resposta das diferentes células é a capacidade de reparo das quebras duplas. O reparo das lesões radioinduzidas ocorre entre 4 e 6 horas após a irradiação (Bitelli, 2006).

As consequências clínicas de uma mudança no DNA dependem de uma série de variáveis. Contudo, se o dano acontecer no DNA em um gene que é responsável pela taxa de divisão celular, a consequência clínica seria a formação de um tumor ou câncer, como é o caso de um dano no gene BRCA, que é supressor de tumor (Bushberg *et al.*, 2002).

✓ Cromossomos

As radiações ionizantes podem induzir quebras cromossômicas e, conseqüentemente, os respectivos rearranjos (Bifulco *et al.*, 2010). São formados fragmentos acêntricos, dicêntricos e

anéis (mutações instáveis), e translocações e inversões (mutações estáveis). As radiações aumentam principalmente a quantidade de mutações estruturais instáveis, como os dicêntricos e anéis, cuja contagem é usada como parâmetro de dosimetria biológica após exposições acidentais à radiação (Bitelli, 2006).

✓ Membranas

As membranas constituem importantes locais de interação com a radiação. Nas membranas a radiação interage com as proteínas estruturais e com os lipídios, provocando a peroxidação lipídica. Sugere-se que, como consequência da peroxidação lipídica, a membrana apresente enfraquecimento em sítios especiais, enquanto a maior parte dela apresenta aumento da rigidez, prejudicando assim a sua função (Bitelli, 2006).

✓ Mutações

A radiação ionizante pode ocasionar mutações (Shapiro, 1990). Mutações são alterações na sequência de DNA que podem levar à alteração na estrutura de proteínas ou à sua diminuição, ou até mesmo à perda completa de sua expressão. Como a mudança na sequência do DNA resulta em alteração de todas as cópias da proteína que ele codifica, as mutações são bastante prejudiciais ao organismo.

As mutações podem envolver pequenas ou grandes porções do DNA. Aquela que ocorre em um par de bases é chamada de mutação pontual, ou a deleção de alguns pares de bases, geralmente afeta a função de um gene. Podem ocorrer, no entanto, grandes alterações na estrutura dos cromossomos e um grande número de genes serem afetados (CNEN).

As mutações podem ocorrer espontaneamente em baixa frequência devido à instabilidade química das bases purinas e pirimidinas e a erros durante a replicação do DNA (Bitelli, 2006). A exposição natural dos organismos a certos fatores ambientais como radiação e agentes carcinogênicos químicos, também causa mutação (Shapiro, 1990). Quando as mutações ocorrem em células germinativas, são transmitidas à geração futura.

4.7.3 MORTE CELULAR RADIOINDUZIDA: CLONOGÊNICA E APOPTOSE

A radiação ionizante pode levar as células à morte de duas maneiras: apoptose e morte clonogênica (Bushberg *et al.*, 2002).

A apoptose é um mecanismo de morte celular ativo, que ocorre em situações fisiológicas em oposição à mitose. Pode também ser induzida por agentes agressores, como radiação. A célula apoptótica apresenta características morfológicas próprias, como condensação, marginalização e fragmentação da cromatina. Posteriormente, sofre fragmentação em corpos apoptóticos que contêm partes da cromatina e organelas citoplasmáticas e são envolvidos por uma membrana. Tais corpos são rapidamente fagocitados pelas células vizinhas (Bitelli, 2006).

A morte clonogênica ou falência reprodutiva caracteriza-se pela perda da capacidade de divisão celular, isto é, a célula fica estéril, porém morfolologicamente íntegra. Tais células que perderam a capacidade de se dividir e que são resistentes à apoptose desenvolverão necrose. Aquelas que são suscetíveis à apoptose podem morrer por necrose ou apoptose, dependendo da dose de radiação (Bushberg *et al.*, 2002): doses baixas induzem à apoptose; doses altas, à necrose (Shapiro, 1990). Observou-se que em linfócitos, doses baixas e moderadas (0,05 a 5 Gy) levam à morte por apoptose, enquanto após doses altas (20 Gy) ocorre a morte não-apoptótica. Explica-se que doses altas de radiação inibem qualquer processo ativo na célula, inclusive a apoptose (Bitelli, 2006).

Quando algum componente essencial da célula está danificado ou algum de seus sítios de controle está desregulado, a célula entra em apoptose ou morte celular programada (Borges-Osório, 2001). Por exemplo, dano ao DNA, ativação de um oncogene ou inativação de um gene supressor de tumor, são fatores que podem desencadear a apoptose. A destruição de uma célula pode ser um evento positivo para o organismo, pois mutações carcinogênicas podem gerar tumores, que surgem de uma célula geneticamente anormal, e que escapa da apoptose (Borges-Osório, 2001). Se após a irradiação das células houver diminuição da população celular, poderia significar que as células sofreram algum dano e entraram no processo de apoptose.

4.7.4 RESPOSTA DOS TECIDOS À RADIAÇÃO

A resposta radiobiológica varia nos diferentes tecidos, normais e/ou patológicos, em relação à lesão. A resposta está relacionada com a capacidade da célula reparar ou não as lesões radioinduzidas. Os tecidos responsáveis pelas manifestações clínicas de lesão em curto período de tempo depois da irradiação são os de resposta rápida, por exemplo: pele, mucosas, tecidos

hematopoiéticos, tecido linfoide, aparelho digestivo, ovário e certos tumores. Associa-se a resposta rápida destes tecidos à alta atividade mitótica (fase bastante radiosensível do ciclo celular) e à grande suscetibilidade desses tecidos à apoptose (Bushberg *et al.*, 2002). Nos tecidos de resposta rápida, as células morrem rapidamente após irradiação, e estes praticamente não reparam as lesões radioinduzidas. No entanto, devido à alta capacidade mitótica e dependendo da dose de radiação, as células precursoras que escaparam da morte possuem grande chance de se dividir e repopular, mantendo assim a homeostase do tecido (Bitelli, 2006).

Os tecidos que apresentam alterações em tempo mais prolongado após irradiação são os de resposta lenta: tecido ósseo, conjuntivo, muscular e nervoso, que possuem baixa atividade proliferativa. Associa-se a resposta lenta à morte clonogênica das células e à menor suscetibilidade à apoptose (Shapiro, 1990). Estes tecidos podem reparar as lesões radioinduzidas, também dependendo da dose de radiação. Porém, esta capacidade é limitada, e quando ultrapassada, a lesão será estabelecida, uma vez que tais tecidos têm pequena atividade mitótica. A resposta dos tecidos à radiação depende ainda do tipo de exposição, se em pequenas regiões ou em corpo inteiro. Em exposições acidentais a altas doses de radiação em corpo inteiro, ocorrerá a síndrome aguda das radiações, e após doses baixas poderão ocorrer mutações e neoplasias (Bitelli, 2006).

4.7.5 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO

O crescimento celular deve ser acompanhado na avaliação dos efeitos da radiação, pois a proliferação sem limites das células é indicativa de câncer (Varella, 2009). O câncer é um termo abrangente para designar um distúrbio genético no qual o controle normal do crescimento celular se perde (Pasternak, 2002; Thompson *et al.*, 1993). De modo geral, uma célula cancerosa é uma célula somática com mutações acumuladas em diferentes genes, resultando em perda do controle da proliferação celular. Como consequência formam-se massas celulares, tumores (Pasternak, 2002).

A taxa de crescimento inalterada das células após a irradiação seria um indicativo que o nível de radiação recebido não foi suficiente para causar danos nas células, ou seja, uma taxa inalterada sugere imunidade das células a este nível de radiação da exposição.

As células cujo material genético foi alterado passam a receber instruções erradas para suas atividades. As alterações podem ocorrer em genes especiais, denominados proto-oncogenes, que promovem o crescimento e a diferenciação nas células normais, sendo expressos em momentos específicos do ciclo celular, mantendo-se inativos em células normais. Quando ativados, os proto-oncogenes transformam-se em oncogenes, responsáveis pela malignização das células normais. Essa ativação pode ocorrer por diferentes mecanismos que incluem erros na sequência genética (mutação), rearranjo no material genético (translocação), perdas de informações contidas em alelos de alguns cromossomos (deleção) e duplicação repetitiva de fragmentos de genes que causam alongamento dos cromossomos (amplificação) (Alberts *et al.*, 2002).

4.7.6 CARIÓTIPO

Cada espécie viva tem um conjunto cromossômico típico (cariótipo) em termos de número e morfologia dos cromossomos. Os genes estão em ordem linear ao longo dos cromossomos, cada gene possuindo uma posição precisa ou *locus*. O mapa gênico, gráfico da localização cromossômica dos genes, também é típico de cada espécie, sendo, até onde se sabe, idêntico a todos os indivíduos da mesma espécie (Thompson *et al.*, 1993).

A análise cromossômica ou cariótipo pode ser realizada em cromossomos obtidos a partir de células nucleadas originadas de diferentes tecidos, submetidos a métodos de preparação citológica direta ou a técnicas de cultivo em laboratório (Pasternak, 2002). Tal procedimento pode ser extremamente útil para a detecção de pequenos rearranjos cromossômicos, tanto constitucionais, como adquiridos, como no câncer (Borges-Osório, 2001).

Capítulo 5. Materiais e Métodos

5.1 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

APÓS a revisão bibliográfica, dois experimentos *in vitro* foram realizados com o objetivo de detectar o nível de exposição de radiação ionizante produzida por mamógrafo, que poderia causar mutação nas células de mama de paciente com predisposição genética ao câncer de mama. Foram utilizadas células vivas cultivadas de uma paciente portadora de uma mutação no gene BRCA.

Os experimentos receberam aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas com seres humanos da UNICAMP.

5.1.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Foi realizada biópsia de mama de paciente de 34 anos portadora da mutação 185delAG (mutação localizada no exon 2 do cromossomo 17) no gene BRCA1 em heterozigose, por suspeita de câncer hereditário. As células retiradas desta biópsia foram cultivadas e preparadas conforme a técnica de cultivo descrita em Beiguelman (1982), que é o mesmo método usado para cultura de fibroblastos. A biópsia foi subdividida em fragmentos menores, cultivados em meio de cultura Ham F-10 com soro fetal bovino a 20% (meio de cultura completo) em tubo de Leighton. Um antibiótico foi acrescentado para impedir a contaminação bacteriana das amostras, que poderia comprometer a sobrevivência das células.

Estas células, divididas em 16 alíquotas, foram então congeladas em nitrogênio líquido. Para que as amostras pudessem ser irradiadas, uma alíquota das células foi descongelada e lançada em 11 tubos com meio de cultura completo para o primeiro experimento.

Para o segundo experimento, realizado alguns meses após o primeiro, o mesmo processo foi adotado. Então uma segunda alíquota das células foi descongelada e lançada em 16 tubos com meio de cultura completo para o segundo experimento.

Uma vez lançadas as amostras, acrescentado o meio de cultura e o antibiótico, os tubos foram colocados em uma estufa à temperatura de 37 °C por sete dias para promover a multiplicação das células. A cada 48 horas foi realizada a troca do meio, e o crescimento celular foi acompanhado por análise microscópica.

O preenchimento celular total da parede do tubo demorou cerca de 7 dias durante os quais as células foram observadas e o crescimento registrado em tabelas para cada tubo de cultura, com a verificação da velocidade da divisão celular. O crescimento celular foi feito por contagem ao microscópio. Para isso cinco áreas de contagem foram demarcadas, na forma de círculos desenhados a caneta na parede externa dos tubos, antes do lançamento da cultura, como mostrado na Figura 6.

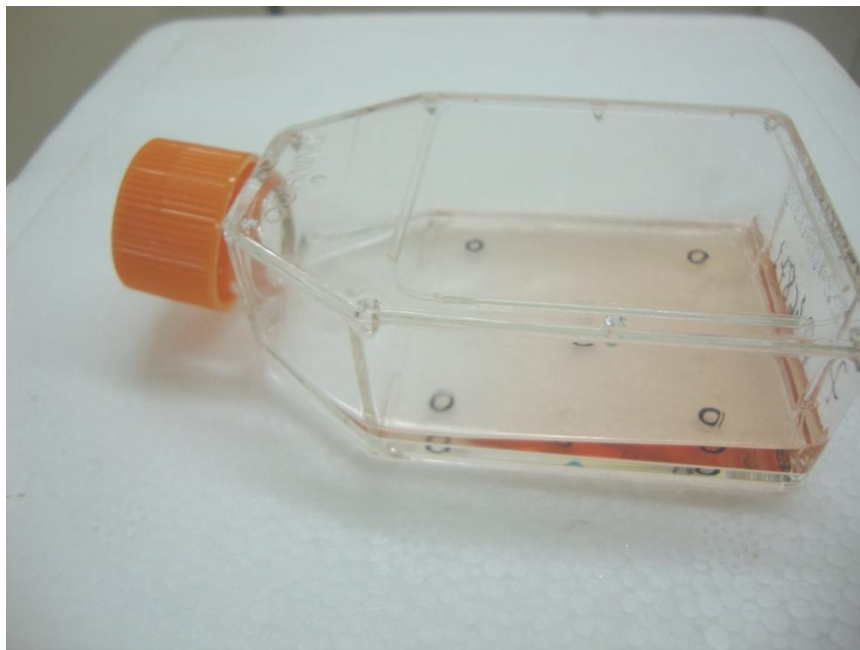


Figura 6 – Tubo de cultura (Leighton) com as áreas de contagem demarcadas na face posterior.

Após os 7 dias, todos os tubos de cultura foram acondicionados em recipiente termoestável fechado, de isopor. Papel toalha foi colocado entre as camadas de tubos para diminuir os choques mecânicos durante o transporte do recipiente, no trajeto de ida e volta do Laboratório de Citogenética da FCM/UNICAMP até o mamógrafo do CAISM (Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher)/UNICAMP, onde receberam as exposições de raios X.

5.1.2 EXPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS

Cada tubo de cultura recebeu uma única exposição de radiação, e a distribuição das doses de cada tubo variaram de 3 mGy a 100 mGy no primeiro experimento, e de 2 mGy a 35 mGy no segundo experimento, conforme aparece nas Tabelas IV e V.

A dose média que uma paciente recebe durante um exame de mamografia de rotina é 3 mGy, e na faixa de 5 mGy para um exame de diagnóstico. Para a investigação da dose capaz de promover mutação foi definido um protocolo com doses escalonadas de 3 a 100 mGy (0,31 a 10,54 R de exposição) em 11 níveis (Tabela IV). Tal extensão de doses foi definida para que com certeza contivesse a dose de gatilho para a mutação (*trigger*) investigada.

Tabela IV – Protocolo de exposição de radiação do experimento 1.

<i>Número do tubo</i>	<i>Dose (mGy)</i>	<i>Exposição (R)</i>	<i>Intensidade (mAs)</i>	<i>Tensão (kVp)</i>
1	3	0,316	28,5	28
2	10	1,141	95	28
3	20	2,283	190	28
4	30	3,424	284	28
5	40	4,218	380	28
6	50	5,272	475	28
7	60	6,327	570	28
8	70	7,381	660	28
9	80	8,436	760	28
10	90	9,490	854	28
11	100	10,545	950	28

O ajuste dos parâmetros do mamógrafo para as diferentes exposições foi feito através da corrente (mA) e do tempo (s). Foi mantida a tensão constante em 28 kVp.

A análise dos resultados desse primeiro experimento através de microscopia revelou haver diferenciação celular, com variação na morfologia celular e apoptose, como será visto no próximo capítulo. Concluiu-se que neste experimento foram usados níveis muito altos de radiação para as células. Por este motivo foi necessário realizar um segundo experimento, com doses menores, para tentar estabelecer uma correlação entre dose de radiação e variação na taxa

de crescimento celular, sem altos índices de apoptose e diferenciação celular, e tentar identificar se esta mutação ocorreu no gene BRCA.

O segundo experimento contou com um número maior de amostras (16 tubos) e o protocolo de exposições foi feito em uma faixa de doses mais estreita, dentro dos valores onde o comportamento das células no primeiro experimento foi sugestivo das mutações investigadas: começou com níveis de radiação inferiores aos que uma pessoa recebe em um exame de mamografia (2 mGy ou 0,23 R), e seguiu com doses escalonadas até um valor máximo de 35 mGy (3,99 R), conforme aparece na Tabela V.

Tabela V – Protocolo de exposição de radiação do experimento 2.

<i>Número do tubo</i>	<i>Dose (mGy)</i>	<i>Exposição (R)</i>	<i>Intensidade (mAs)</i>	<i>Tensão (kVp)</i>
1	2	0,23	36	28
2	3	0,34	45	28
3	5	0,57	80	28
4	6	0,68	100	28
5	8	0,91	141	28
6	10	1,14	174	28
7	13	1,48	236	28
8	15	1,71	271	28
9	17	1,94	296	28
10	20	2,28	340	28
11	23	2,62	400	28
12	25	2,85	436	28
13	27	3,08	477	28
14	30	3,42	524	28
15	33	3,76	580	28
16	35	3,99	616	28

Antes e após a irradiação, o crescimento celular foi registrado diariamente e realizado o exame de cariótipo no Laboratório de Citogenética da FCM/UNICAMP, para verificar a ocorrência de quebras ou outras alterações cromossômicas.

As exposições foram realizadas da seguinte maneira: cada tubo de cultura foi colocado no eixo principal do feixe de raios X do mamógrafo, posicionado na mesa de apoio para a mama

(no local onde ficaria a mama de uma paciente em um exame mamográfico), diretamente sobre a câmara de ionização do dosímetro, como mostrado nas Figuras 7 e 8.

O equipamento escolhido para os ensaios foi o mamógrafo do CAISM/UNICAMP (Siemens, modelo Mammomat 3000), utilizado para exames de rotina e de diagnóstico em pacientes da região de Campinas.

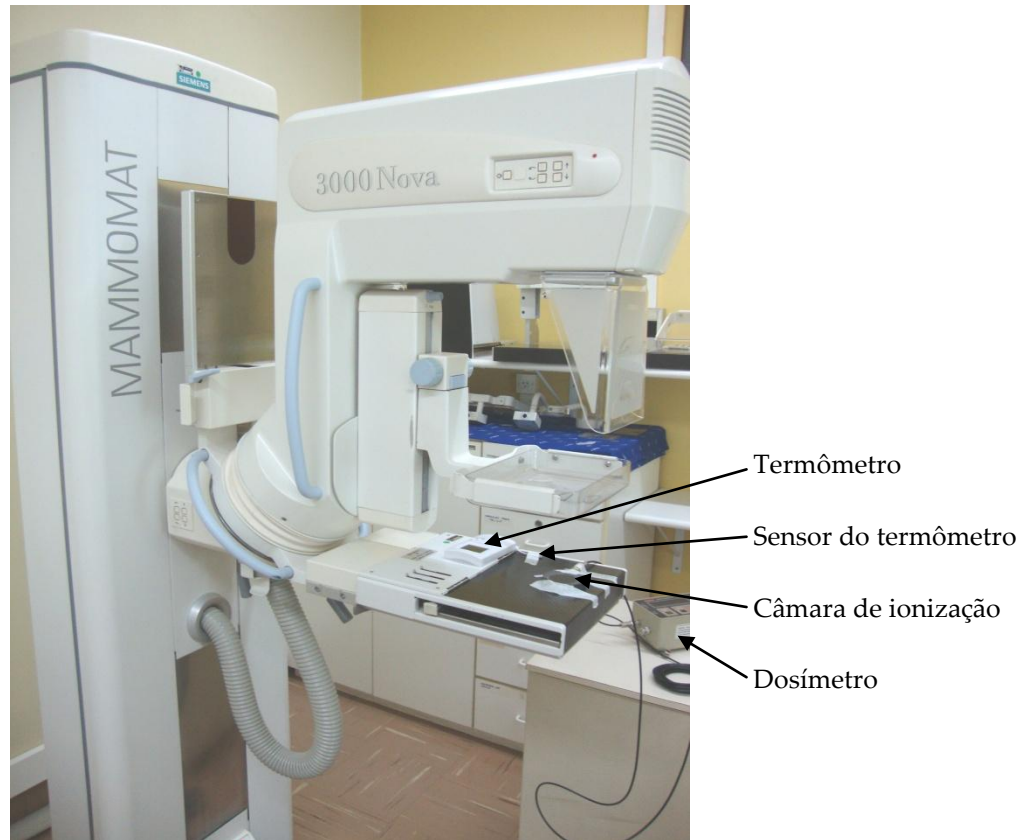


Figura 7 – Mamógrafo do CAISM e a montagem utilizada nos experimentos.

O Mammomat 3000 possui anodo de molibdênio (Mo), controle de tempo de exposição automático (AEC – *Automatic Exposure Control*) que faz uso de uma célula fotoelétrica para controlar o tempo de exposição. Pode-se também realizar o controle manual da exposição, variando a tensão (kVp) ou a corrente (mA) e o tempo (s) (Siemens, 2004).

A tensão usada para mamografia varia de entre 28 e 32 kVp, para a maioria dos exames, valor que depende normalmente da espessura da mama. Geralmente, depois de comprimidas, as mamas ficam com espessura entre 3 e 8 cm (Siemens, 2004).

Para a medição das exposições foi utilizados um dosímetro (Keithely, modelo 35050A), e uma câmara de ionização de 15 cm³, calibrada à pressão atmosférica (Keithely, modelo 96035), pertencentes ao Centro de Engenharia Biomédica (CEB)/UNICAMP. A temperatura do ambiente próxima à câmara de ionização foi monitorada com termômetro eletrônico, e a pressão atmosférica do dia foi obtida junto ao Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura (CEPAGRI)/UNICAMP. Este monitoramento é necessário para verificar se as condições de medição diferem das de calibração da câmara de ionização.

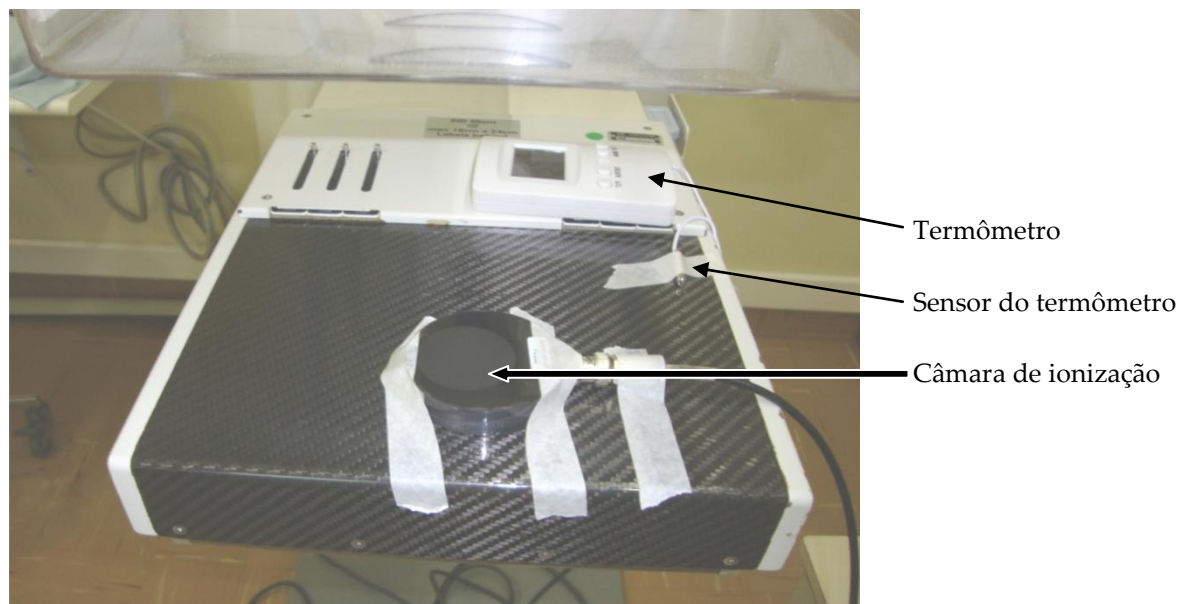


Figura 8 – Dosímetro da câmara de ionização na mesma posição da mama em um exame de mamografia.
À direita aparece o sensor do termômetro.

Depois de realizadas todas as exposições, os tubos de cultura foram novamente acondicionados no recipiente de isopor e levados de volta à estufa no Laboratório de Citogenética da FCM/UNICAMP. As células foram então observadas por mais 7 dias, para avaliação do seu estado e crescimento em cada tubo. Os resultados aparecem na Tabela VI.

5.1.3 ANÁLISE DAS AMOSTRAS IRRADIADAS

Após as irradiações os tubos de cultura foram analisados no Laboratório de Citogenética da FCM/UNICAMP. A análise constou de avaliação de alterações citológicas perceptíveis por

microscopia óptica (alteração no padrão citoplasmático, cariótipo), além de observação do padrão e velocidade de crescimento das células. Para esta observação, uma nova cultura foi feita a partir das células irradiadas.

Um crescimento celular reduzido ou nulo é sugestivo de dano celular e apoptose; uma taxa de crescimento inalterada após a irradiação é indicativo que o nível de radiação recebido não foi suficiente para causar danos nas células, sugerindo imunidade das células ao nível de radiação da exposição. Por outro lado, o crescimento acelerado ou desordenado é indicativo de alteração no metabolismo celular, e pode ser associado ao desenvolvimento de tumor.

Capítulo 6. Resultados

NESTE capítulo são apresentados os resultados dos dois experimentos *in vitro* realizados. Na Tabela VI aparecem os resultados do primeiro experimento, acrescidos aos dados da Tabela IV.

Como o protocolo de exposição de radiação neste experimento envolveu níveis de radiação mais altos do que no segundo experimento, pode-se observar que na maioria das amostras ocorreu dano celular e diminuição do índice mitótico. Quando este processo ocorre, cessa a divisão e as células passam a apresentar características diferenciadas e especializadas.

Tabela VI – Resultados do primeiro experimento.

<i>Número do tubo</i>	<i>Dose (mGy)</i>	<i>Exposição (R)</i>	<i>Intensidade (mAs)</i>	<i>Tensão (kVp)</i>	<i>Dano celular</i>
1	3,08	0,35	56	28	Não
2	9,36	1,07	140	28	Não
3	19,38	2,21	300	28	Sim
4	27,56	3,15	432	28	Sim
5	38,11	4,35	622	28	Não
6	45,11	5,15	740	28	Não
7	55,59	6,35	850	28	Sim
8	64,08	7,31	1.000	28	Sim
9	73,84	8,43	1.040	28	Sim
10	82,92	9,46	1.280	28	Sim
11	91,95	10,49	1.432	28	Sim

Através da contagem celular durante a análise microscópica foram observadas as taxas de crescimento e feita a comparação antes e depois da irradiação.

Os resultados do segundo experimento são um pouco diferentes, pois o protocolo de exposição foi desenvolvido para níveis menores de radiação. Os dados da Tabela VII mostram a correspondência entre o valor da exposição e a variação da taxa de crescimento em células por hora e em porcentagem do aumento do número de células, depois da radiação em relação ao

crescimento anterior à radiação.

Tabela VII – Resultados do segundo experimento.

<i>Número do tubo</i>	<i>Dose (mGy)</i>	<i>Exposição (R)</i>	<i>Intensidade (mAs)</i>	<i>Variação da taxa de crescimento (células/hora)</i>	<i>Variação da taxa de crescimento</i>
1	2	0,23	36	0,8	12,3%
2	3	0,34	45	1,0	18,0%
3	5	0,57	80	1,53	25,8%
4	6	0,68	100	1,39	23,0%
5	8	0,91	141	2,78	42,7%
6	10	1,14	174	4,17	80,6%
7	13	1,48	236	5,55	219,1%
8	15	1,71	271	5,6	121,7%
9	17	1,94	296	3,23	198,3%
10	20	2,28	340	4,05	218,4%
11	23	2,62	400	4,61	240,7%
12	25	2,85	436	4,78	253,5%
13	27	3,08	477	4,77	286,3%
14	30	3,42	524	5,0	433,3%
15	33	3,76	580	4,95	433,5%
16	35	3,99	616	7,44	540,6%

Com esses dados foi possível estabelecer uma linearização do conjunto de pontos do crescimento celular observado em cada tubo de cultura. Estes pontos foram aproximados por retas, para cada taxa de crescimento de cada tubo de cultura, gerando gráficos que representam o número de células contados em cada tubo ao longo do tempo, antes e depois da radiação. Para cada gráfico foi calculada a equação da reta e o seu coeficiente angular. A taxa de crescimento médio de cada amostra é representada por este coeficiente angular. Os gráficos das taxas de cada tubo de cultura são apresentados no Apêndice.

Foi então feita a comparação entre os coeficientes angulares destas retas, antes e depois das irradiações, o que permitiu estabelecer a forma como cada nível de radiação contribuiu para modificar a taxa de crescimento celular. As diferenças são representadas no gráfico da Figura 9.

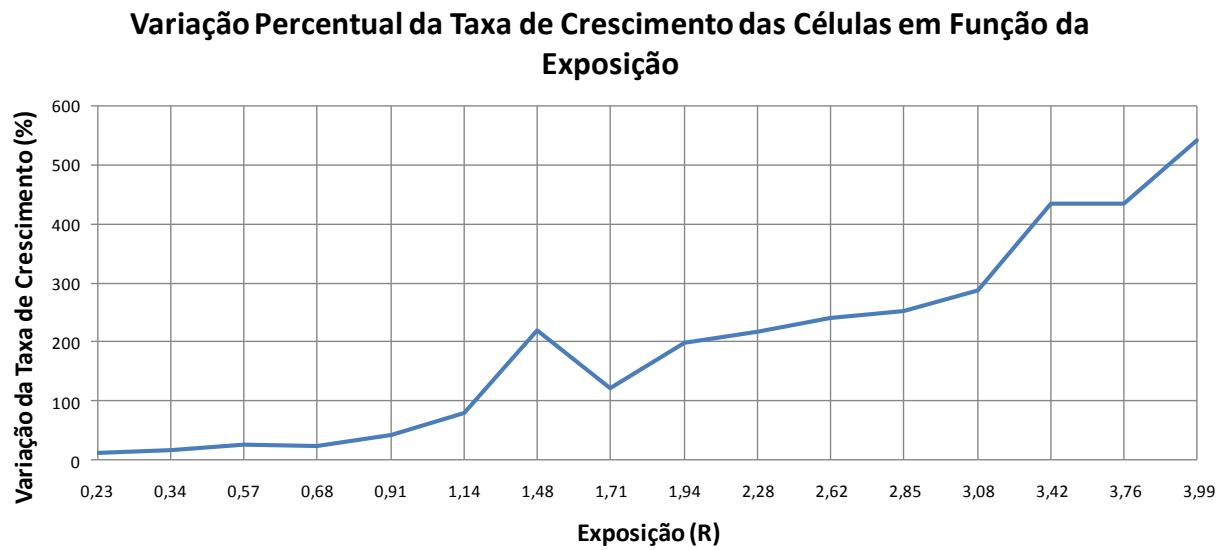


Figura 9 – Variação da taxa de crescimento (%) *versus* exposição (R).

Capítulo 7. Discussão

Os resultados do primeiro experimento (Tabela VI) indicam alteração na maioria das amostras (em sete das onze amostras). Não foram encontradas alterações no cariótipo das células pós-irradiação, em nenhum dos dois experimentos. O cariótipo mostra apenas alterações maiores no DNA, grandes perdas, pedaços, ganhos, trocas; as mutações pequenas não são visualizadas neste exame. No entanto, apesar de nenhuma alteração visível ter sido encontrada, não se pode descartar a ocorrência de mutações gênicas em função das alterações nas taxas de crescimento celular observadas. Outro fato importante é que no primeiro experimento houve um alto índice de apoptose (morte celular) em decorrência do acúmulo de alterações desencadeadas pela radiação, o que impossibilitou especificar a(s) mutação(ões).

Estas constatações foram úteis para a definição do segundo experimento, dentro de uma faixa de doses mais estreita e centrada em valores menores de radiação, para que fosse possível verificar se haveria variação na velocidade de divisão celular sem a ocorrência de apoptose. O protocolo de exposição foi apresentado na Tabela V para 16 amostras de células, onde os níveis de radiação das exposições variaram desde metade da dose de um exame de mamografia diagnóstica típico, até para seis vezes este valor.

Os resultados deste segundo experimento foram analisados através do crescimento celular, uma vez que o crescimento desordenado é indicativo de alteração no metabolismo celular, e pode ser associado ao desenvolvimento de tumor. Inicialmente foi contabilizado o número de células desde o seu lançamento nos tubos de cultura, até após a irradiação. Esta contabilização permitiu estabelecer a taxa média de crescimento celular em cada tubo de cultura antes e após as exposições à radiação, e a variação percentual do crescimento em função da exposição. Os resultados são mostrados na Tabela VI e Figura 9.

Na maioria das amostras de células, o crescimento e multiplicação celular foram maiores após a exposição das amostras à radiação. No último tubo de cultura, a taxa de crescimento foi consideravelmente maior do que a taxa de crescimento das células antes da radiação, sugerindo

que nesta faixa de dose a radiação efetivamente promoveu alteração no crescimento celular, o que é um forte indicativo de mutação celular. O tubo de cultura nº 7 apresentou um crescimento celular superior a 200% após irradiação equivalente a 13 mGy. Este resultado sugere modificação do cariótipo, crescimento desordenado, indicando princípio de tumor.

Tal valor de dose (cerca de 13 mGy) equivale à radiação de três exames de mamografia diagnóstica seguidos em uma paciente. Em uma avaliação diagnóstica, duas incidências em cada mama são necessárias: uma visão lateral ou oblíqua e uma crânio-caudal (Siemens, 2004). Assim, se a paciente receber três incidências consecutivas em cada mama, pode-se afirmar que está sujeita a um risco de sofrer alterações no crescimento celular, que podem degenerar para a formação de um câncer de mama.

Nas condições experimentais deste trabalho, além das análises de taxa de crescimento *in vitro* não serem específicas para o gene BRCA, todos os mecanismos de proteção contra a proliferação de células mutantes existentes *in vivo* estão ausentes.

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam que houve alteração no controle da divisão celular na maioria dos tubos de cultura dos dois experimentos, relacionado aos respectivos protocolos de exposição, ou seja, a radiação. Conseguiu-se estimar uma dose de radiação acima da qual o comportamento reprodutivo das células é indicativo de risco aumentado de desenvolvimento de tumor em paciente portadora da primeira mutação. Este valor de dose, que é de aproximadamente 13 mGy, equivalente à dose de três exames diagnósticos de mamografia, ou mais de quatro exames de mamografia de rotina.

As principais limitações do presente estudo dizem respeito à impossibilidade atual de determinar o efeito da dose irradiada precisamente no gene BRCA. Somente uma avaliação em nível molecular (sequenciamento do gene) permitirá determinar os danos sofridos neste gene, de forma seletiva.

Outro protocolo experimental pode representar uma forma alternativa de antecipar estes resultados: realizar uma bateria de exposições semelhantes às realizadas no experimento 2, mas com três conjuntos de amostras:

1) células cultivadas de portador de uma mutação nos gene BRCA (semelhante ao presente estudo);

2) células cultivadas pelo mesmo processo, porém sem mutação diagnosticada no gene BRCA (paciente sem predisposição genética);

3) células cultivadas de paciente portador de outra forma de predisposição ao câncer, que não o BRCA ou o câncer de mama.

Com este novo protocolo experimental será possível estabelecer com mais certeza o nível de radiação que promove alterações em células com predisposição genética ao câncer, comparando-o ao de células sem esta predisposição (uma vez que o limiar de alteração pode ser diferente no caso da célula predisposta). Ao mesmo tempo, o nível de radiação que promove alterações em células com a predisposição a outros tipos de câncer permitirá conhecer se o limiar de dose é característico de um determinado tipo de câncer.

Outra preocupação a ser adotada nos próximos experimentos é o levantamento do “histórico mamográfico” da paciente doadora das células. Quantas mamografias foram já realizadas com certeza antes do presente protocolo experimental? Há alguma forma de “efeito acumulativo” nas modificações celulares causadas pelas radiações ionizantes?

Neste sentido, apesar de ainda inconclusivo em relação ao objetivo inicial (determinação do limiar de exposição para promover alterações no gene BRCA), este trabalho deu passos importantes nesta direção, e confirmou resultados da literatura de que as radiações ionizantes de baixas doses são responsáveis pela alteração nos mecanismos de reprodução celular, e que doses excessivas podem determinar a morte celular (Cardoso, 2000; Martinou, 2011).

Como ganho suplementar, este trabalho possibilitou o desenvolvimento de uma metodologia para experimentos *in vitro* que não havia sido encontrada na literatura atual, para a determinação de possível dose limiar de alteração no comportamento celular. A descrição da manipulação das amostras, dos protocolos de exposição e a análise dos resultados se mostraram bastante úteis para a continuidade das pesquisas nesta área.

Capítulo 8. Conclusão

DETERMINAR uma dose de raios X que traga menos riscos à saúde de pacientes portadores de uma predisposição genética ao câncer, em particular nos genes BRCA1 e BRCA2, é de grande importância para guiar médicos e técnicos dentre as diferentes alternativas diagnósticas e terapêuticas.

Os resultados deste trabalho sugerem que o exame de diagnóstico da mamografia, quando significar uma exposição em cada mama por três vezes seguidas, pode promover alteração no comportamento celular, e portanto este exame talvez devesse ser substituído, quando possível, por tecnologias não ionizantes de diagnóstico por imagem, como a ultrassonografia ou a ressonância magnética, que são tecnologias menos lesivas e bem consolidadas nos dias atuais, além da moderna tecnologia de espectroscopia Raman.

O risco da radiação ionizante da mamografia é maior em mulheres jovens, e este exame não traz o mesmo benefício que traria para mulheres com mais de 50 anos, pois as mamas de mulheres pré-menopausa são mais densas, o que torna mais difícil distinguir microcalcificações ou outras anomalias em tecido glandular mais denso, além de exigirem níveis mais elevados de radiação para uma visualização com um mínimo de qualidade na imagem.

Este trabalho resultou na determinação de um nível de dose de risco de alteração celular para células *in vitro*, que pode ser transposto para doses de mamografias *in vivo* e, portanto a ser evitado na rotina médica. Por outro lado, o desenvolvimento da metodologia de ensaios foi importante para a continuidade das pesquisas nesta área.

A realização deste trabalho também evidenciou a necessidade de mais experimentos como forma de responder às novas hipóteses e questionamentos que surgiram ao longo dos experimentos: a dose limiar para promover alterações perceptíveis nas células é a mesma no caso de células saudáveis, ou em células de portadores de outros tipos de mutações? Em outras palavras, o valor de dose limiar encontrado é próprio das portadoras da mutação no gene

BRCA? Qual a participação do “histórico mamográfico” da paciente portadora da mutação no gene BRCA no valor desse limiar? Há efeito cumulativo de dose?

Estas e outras questões serão respondidas nos estudos que sucederão a este, e constituem os próximos passos desta pesquisa.

Referências Bibliográficas

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. 4th ed., Nova Iorque: Garland Science, 2002, 1616 p.
- ANDRIEU, N.; EASTON, D.F.; CHANG-CLAUDE, J.; ROOKUS, M.A.; BROHET, R.; CARDIS, E.; ANTONIOU, A.C.; WAGNER, T.; SIMARD, J.; EVANS, G.; PEOCK, S.; FRICKER, J.P.; NOGUES, C.; VAN'T VEER, L.; VAN LEEUWEN, F.E.; GOLDGAR, D.E. Effect of chest X-rays on the risk of breast cancer among BRCA1/2 mutation carriers in the international BRCA1/2 carrier cohort study: a report from the EMBRACE, GENEPSO, GEO-HEBON, and IBCCS Collaborators' Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 21, p. 3361-3366, 2006.
- BAKKENIST, C.J.; KASTAN, M.B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. **Nature**, v. 421, p. 499-506, 2003.
- BARWELL, J.; PANGON, L.; GEORGIOU, A.; KESTERTON, I.; LANGMAN, C.; ARDEN-JONES, A.; BANCROFT, E.; SALMON, A.; LOCKE, I.; KOTE-JARAI, Z.; MORRIS, J.R.; SOLOMON, E.; BERG, J.; DOCHERTY, Z.; CAMPLEJOHN, R.; EELES, R.; HODGSON, S. Lymphocyte radiosensitivity in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers and implications for breast cancer susceptibility. **International Journal of Cancer**, v. 121, n. 7, p. 1631-1637, 2007.
- BEIGUELMAN, B. **Citogenética Humana**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1982.
- BENNETT, L.M. Breast cancer: genetic predisposition and exposure to radiation. **Molecular Carcinogenesis**, v. 26, n. 3, p. 143-149, 1999.
- BENSON, J. Is screening mammography safe for high-risk patients? **The Lancet Oncology**, v. 7, n. 5, p. 360-362, 2006.
- BERNSTEIN, J.L.; TERAOKA, S.N.; JOHN, E.M.; ANDRULIS, I.L.; KNIGHT, J.A.; LAPINSKI, R.; OLSON, E.R.; WOLITZER, A.L.; SEMINARA, D.; WHITTEMORE, A.S.; CONCANNON, P. The *CHEK2*1100delC* allelic variant and risk of breast cancer: screening results from the breast cancer family registry. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 15, n. 2, p. 348-352, 2006.
- BERRINGTON DE GONZÁLES, A.; REEVES, G. Mammographic screening before age 50 years in the UK: comparison of the radiation risks with the mortality benefits. **British Journal of Cancer**, v. 93, n. 5, p. 590-596, 2005.

- BERRINGTON DE GONZÁLES, A.; BERG C. D.; VISVANATHAN, K.; ROBSON, M. Estimated risk of radiation induced breast cancer from mammographic screening for young BRCA mutation carriers. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 3, p. 205-209, 2009.
- BERTWISTLE, D.; ASHWORTH, A. Functions of the BRCA1 and BRCA2 genes. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 8, n. 1, p. 14-20, 1998.
- BIGGS, P.J.; BRADLEY, A. A step toward genotype-based therapeutic regimens for breast cancer in patients with BRCA mutations? **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 13, p. 951-953, 1998.
- BIFULCO, V.A.; FERNANDEZ Jr., H.J.; BARBOZA, A.B. **Câncer: uma visão multiprofissional**. Barueri: Manole, 2010, 479 p.
- BIRAL, A.R. **Radiações Ionizantes para Médicos, Físicos e Leigos**. 1ª ed., Florianópolis: Insular, 2002. 250 p.
- BITELLI, T. **Física e Dosimetria das Radiações**. 2ª ed., São Paulo: Atheneu, 2006.
- BLACK, W.C.; HAGGSTROM, D.A.; WELCH, H.G. All-cause mortality in randomized trials of cancer screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, n. e, p. 167-173, 2002.
- BORGES-OSÓRIO, M.R. **Genética Humana**. 2ª ed., Porto Alegre: Artmed Editora, 2001.
- BRENNER, D.J.; DOLL, R.; GOODHEAD, D.T.; HALL, E.J.; LAND, C.E.; LITTLE, J.B.; LUBIN, J.H.; PRESTON, D.L.; PRESTON, R.J.; PUSKIN, J.S.; RON, E.; SACH, R.K.; SAMET, J.M.; SETLOW, R.B.; ZAIDER, M. Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: Assessing what we really know. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 100, n. 24, 13761-13766, 2003.
- BROEKS, A.; BRAAF, L.M.; HUSEINOVIC, A.; NOOIJEN, A.; URBANUS, J.; HOGERVORST, F.B.L.; SCHMIDT, M.K.; KLIJN, M.G.J.; RUSSEL, N.S.; VAN LEEUWEN, F.E.; VERR, L.J.V. Identification of women with an increased risk of developing radiation-induced breast cancer: a case only study. **Breast Cancer Research**, v. 9, n. 2, p. R26, 2007.
- BUSHBERG, J.T.; SEIBERT, J.A.; LEIDHOLDT Jr., E.M.; BOONE, J.M. **The Essential Physics of Medical Imaging**. 2ª ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002, 933 p.
- CARDOSO, S.R. **Estudo Citogenético e Molecular da Resposta à Radiação Ionizante em Células Transfectadas com o Oncogene HA-RAS**. Dissertação (Mestrado) - USP, Ribeirão Preto, Departamento de Genética Médica, 2000.
- CHEN, J.J.; SLIVER, D.; CANTOR, S.; LIVINGSTON, D.M.; SCULLY, R. BRCA1, BRCA2, and Rad51 operate in a common DNA damage response pathway. **Cancer Research**, v. 59, n. 7 (Suppl), p. 1752s-1756s, 1999.
- CNEN – COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR **Radiações Ionizantes e a Vida**, NOUAILHETAS, Y. (Org.). Disponível em <http://www.cnen.gov.br/ensino/apostilas/rad_ion.pdf>.
- EISINGER, F. Le dépistage des cancers du sein chez les femmes à haut risque familial. **Bulletin du Cancer**, v. 92, n. 10, p. 874-884, 2005.

- FAULKNER, K. Mammography screening and genetic disposition to radiation risk. **The British Journal of Radiology**, v. 80, n. 956, p. 591-592, 2007.
- GOLDFRANK, D.; CHUAI, S.; BERNSTEIN, J.L.; RAMÓN Y CAJAL, T.; LEE, J.B.; ALONSO, M.C.; DIEZ, O.; BAIGET, M.; KAUFF, N.; OFFIT, K.; ROBSON, M. Effect of mammography on breast cancer risk in women with mutations in BRCA1 or BRCA2. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 15, n. 11, p. 2311-2313, 2006.
- GRONWALD, J.; PIJPE, A.; BYRSKI, T.; HUZARSKI, T.; STAWICKA, M.; CYBULSKI, C.; VAN LEEUWEN, F.; LUBIŃSKI, J.; NAROD, S.A. Early radiation exposures and BRCA1-associated breast cancer in young women from Poland. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 112, n.3, p. 581-584, 2008.
- GULATI, A.P.; DOMCHECK, S.M. The clinical management of BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. **Current Oncology Reports**, v. 10, n.1, p. 47-53, 2007.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.C. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 1014 p.
- HAYT Jr., W.H. **Eletromagnetismo**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora, 1978. 538 p.
- HILL, D.A.; PRESTON-MARTIN, S.; ROSS, R.K. Medical radiation, family history of cancer, and benign breast disease in relation to breast cancer risk in young women, USA. **Cancer Causes and Control**, v. 13, n. 8, p. 711-718, 2002.
- ICRU – INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIATION UNITS AND MEASUREMENTS. **Radiation quantities and units**. ICRU Report 33. Washington, D.C., 1980.
- INCA – INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Mamografia: da prática ao controle**. Ministério da Saúde. Rio de Janeiro: INCA, 2007.
- JACKSON, D.J. **Classical Electrodynamics**. 3th ed., Danvers: John Wiley & Sons, Inc. 1999. 833 p.
- JOHNS, H.E.; CUNNINGHAM, J.R. **The Physics of Radiology**. 4th ed., Illinois: Charles C. Thomas Publisher, 1983. 796 p.
- JUFFS, H.G.; TANNOCK, I.F. Screening trials are even more difficult than we thought they were. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, n. 3, p. 156-157, 2002.
- KASTAN, M.B.; LIM, D.-S.; KIM, S.-T.; YANG, D. ATM – a key determinant of multiple cellular responses to irradiation. **Acta Oncologica**, v. 40, n. 6, p. 686-688, 2001.
- LANE, D. Awakening angels. **Nature**, v. 394, n. 6694, p. 616-617, 1998.
- LEHMAN, C.D.; WHITE, E.; PEACOCK, S.; DRUCKER, M.J.; URBAN, N. Effect of age and breast density on screening mammograms with false-positive findings. **American Journal of Roentgenology**, v. 173, n. 6, p. 1651-1655, 1999.
- LEVY-LAHAD, E.; FRIEDMAN, E. Cancer risks among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. **British Journal of Cancer**, v. 96, n. 1, p. 11-15, 2007.

- MA, H.; HILL, C.K.; BERNSTEIN, L.; URSIN, G. Low-dose medical radiation exposure and breast cancer risk in women under age 50 years overall and by estrogen and progesterone receptor status: results from a case-control and a case-case comparison. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 109, n. 1, p. 77-90, 2008.
- MARTINO, M.; GIANNOPOULOU, E.; MALATARA, G.; ARGYRIOU, A.A.; KALOFONOS, H.P.; KARDAMAKIS, D. Ionizing radiation affects epidermal growth factor receptor signalling and metalloproteinase secretion in glioma cells. **Cancer Genomics and Proteomics**, v. 8, p. 33-38, 2011.
- MENDOZA, R.E.C. **Determinação de grandezas dosimétricas de interesse em mamografia usando detectores termoluminescentes**. 2010. 65 f. Dissertação (Mestrado) - USP, Ribeirão Preto, 2010.
- MOLLER, P.; EVANS, G.; HAITES, N.; VASEN, H.; REIS, M.M.; ANDERSON, E.; APOLD, J.; HODGSON, S.; ECCLES, D.; OLSSON, H.; STOPPA-LYONNET, D.; CHANG-CLAUDE, J.; MORRISON, P.J.; BEVILACQUA, G.; HEIMDAL, K.; MÆHLE, L.; LALLOO, F.; GREGORY, H.; PREECE, P.; BORG, Å.; NEVIN, N.C.; CALIGO, M.; STEEL, C.M. Guidelines for follow-up of women at high risk for inherited breast cancer: consensus statement from Biomed 2 Demonstration Programme on inherited breast cancer. **Disease Markers**, v. 15, n. 1, p. 207-211, 1999.
- MOREIRA-FILHO, A.C.; VERJOVSKY-ALMEIDA, S. Genoma Clínico – O impacto da genética genômica na prática médica. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 16 p. 162-167, 2000.
- MOSS, S.M.; CUCKLE, H.; EVANS, A.; JOHNS, L.; WALLER, M.; BOBROW, L.; TRIAL MANAGEMENT GROUP. Effect of mammographic screening from age 40 years on breast cancer mortality at 10 years' follow-up: a randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 368, n. 9552, p. 2053-2060, 2006.
- NAROD, S.A.; LUBINSKI, J.; GHADIRIAN, P.; LYNCH, H.T.; MOLLER, P.; FOULKES, W.D.; ROSEN, B.; KIM-SING, C.; ISAACS, C.; DOMCHECK, S.; SUN, P. Screening mammography and risk of breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a case-control study. **Lancet Oncology**, v. 7, n. 5, p. 402-406, 2006.
- NEWMAN, B.; AUSTIN, M.A.; LEE, N.; KING, M.C. Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 85, n. 9, p. 3044-3048, 1988.
- NIST – NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. Disponível em <<http://www.nist.gov/index.html>>. Acesso em Setembro, 2010.
- NORMAN, R.P.A.; EVANS, D.G.; EASTON, D.F.; YOUNG, K.C. The cost-utility of magnetic resonance imaging for breast cancer in BRCA1 mutation carriers aged 30-49. **The European Journal of Health Economics**, v. 8, n. 2, p. 137-144, 2007.

- NYSTRÖM, L.; ANDERSSON, I.; BJURSTAM, N.; FRISSELL, J.; NORDENSKJÖLD, B.; RUTQVIST, L.E. Long-term effects of mammography screening: updated overview of the Swedish randomised trials. **The Lancet**, v. 359, n. 9310, p. 909-919, 2002.
- PASTERNAK, J.J. **Genética Molecular Humana**: mecanismos das doenças hereditárias. Barueri: Manole, 2002. 497 p.
- PATEL, K.J.; YU, V.P.C.; LEE, H.S.; CORCORAN, A.; THISTLETHWAITE, F.C.; EVANS, M.J.; COLLEDGE, W.H.; FRIEDMAN, L.S.; PONDER, B.A.J.; VENKITARAMAN, A.R. Involvement of BRCA2 in DNA repair. **Molecular Cell**, v. 1, n. 3, p. 347-357, 1998.
- RAHMAN, N.; STRATTON, M.R. The genetics of breast cancer susceptibility. **Annual Review of Genetics**, v. 32, p. 95-121, 1998.
- SHAPIRO, J. **Radiation Protection**: A Guide for Scientists and Physicians. 3rd ed. Cambridge: Harvard University Press, 1990. 520 p.
- SIEMENS, AG. **Mammography Applications for MAMMOMAT 1000/3000 Nova**, Germany, #A91100-M1600-C924-1-7600, 2004.
- THOMPSON, D.; EASTON, D. The genetic epidemiology of breast cancer genes. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**; v. 9, n. 3, p. 221-236, 2004.
- THOMPSON, M.W.; McINNES, R.R.; WILLARD, H.F. **Genética Médica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1993. 339 p.
- VARELLA, D. **Guia Prático de Saúde e Bem-Estar: Cânceres**. São Paulo: Gold Editora, 2009.
- YOUNG, K.C.; BURCH, A. Radiation doses received in the UK Breast Screening Programme in 1997 and 1998. **The British Journal of Radiology**, v. 73, n. 867, p. 278-287, 2000.

Apêndice

Gráficos das Taxas de Crescimento dos Tubos de Cultura

Este apêndice apresenta os gráficos de crescimento celular nos tubos de cultura do experimento 2. As linhas azuis representam as taxas de crescimento antes da radiação, as linhas vermelhas representam as taxas de crescimento depois da radiação, com as respectivas equações de reta.

É possível observar que em todos os tubos, as retas vermelhas possuem uma inclinação maior do que as retas em azul, evidenciando que as células cresceram mais rapidamente depois da irradiação.

Taxas de Crescimento Tubo 1 Diferença Angular 1,20°

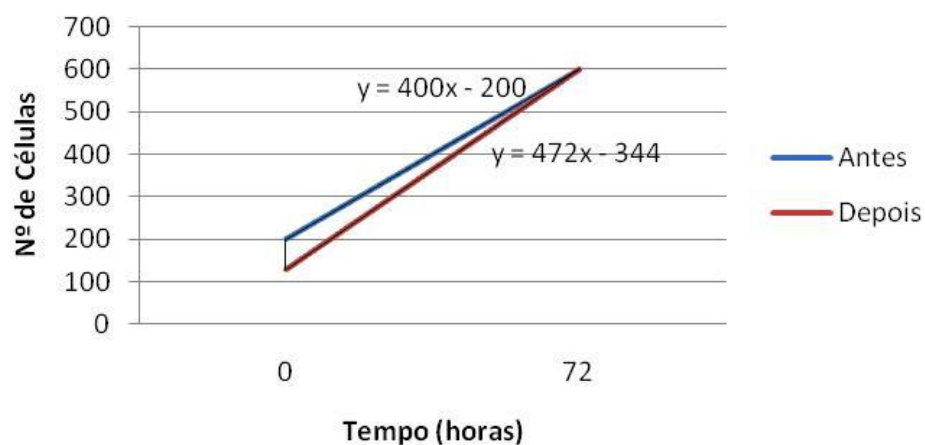


Figura 10 – Taxa de crescimento 1 antes e depois da irradiação das células, variação angular entre as duas retas 1,20°.

Taxas de Crescimento Tubo 2 Diferença Angular 1,05°

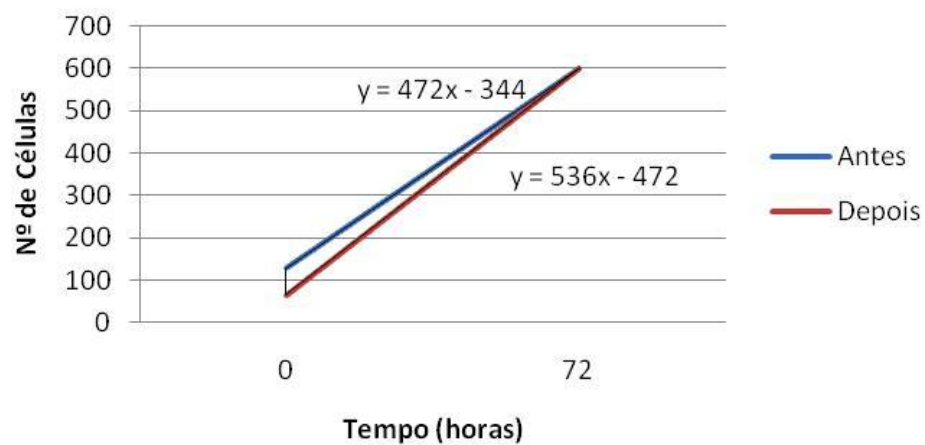


Figura 11 – Taxa de crescimento 2 antes e depois da irradiação das células, variação angular entre as duas retas 1,05°.

Taxas de Crescimento Tubo 3 Diferença Angular 1,61°

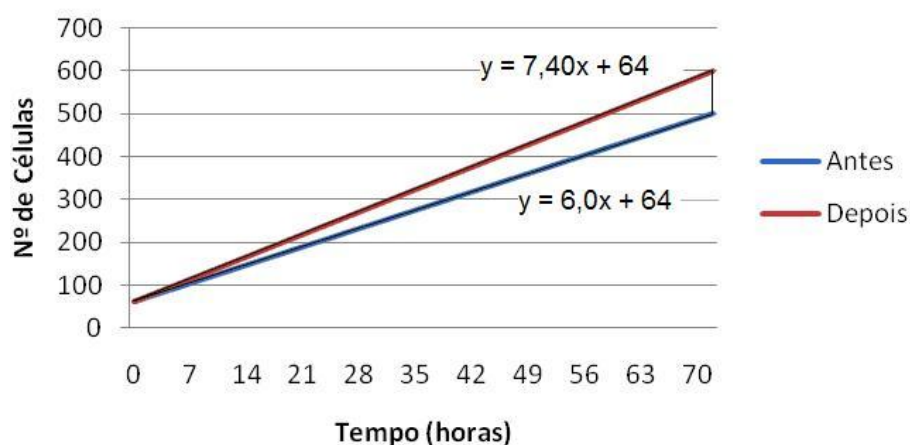


Figura 12 – Taxa de crescimento 3 antes e depois da irradiação das células, variação angular entre as duas retas-1,61°.

Taxas de Crescimento Tubo 4 Diferença Angular 1,68°

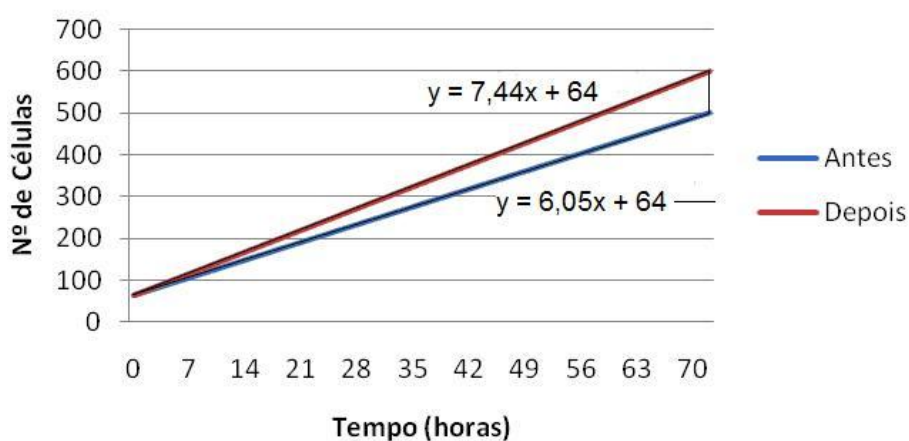


Figura 13 – Taxa de crescimento 4 antes e depois da irradiação das células, variação angular entre as duas retas 1,68°.

Taxas de Crescimento Tubo 5 Diferença Angular 2,56°

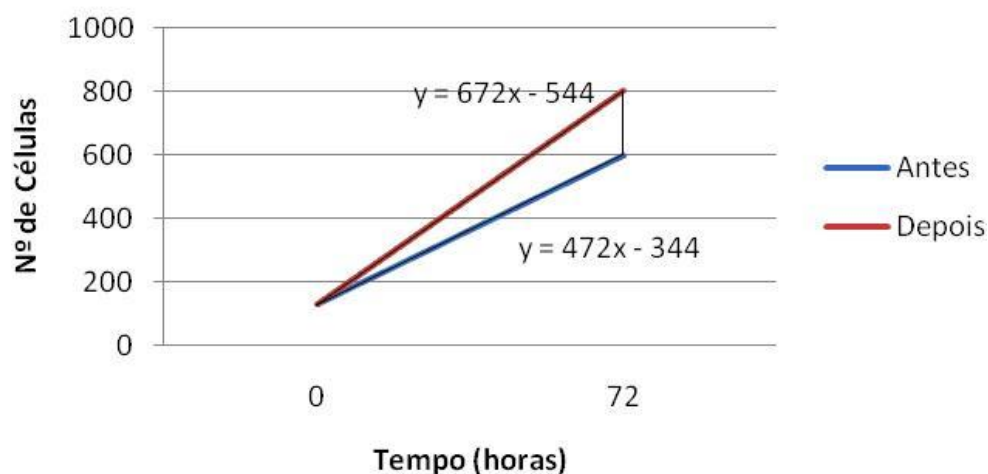


Figura 14 – Taxa de crescimento 5 antes e depois da irradiação das células, variação angular entre as duas retas 2,56°.

Taxas de Crescimento Tubo 6 Diferença Angular 4,83°

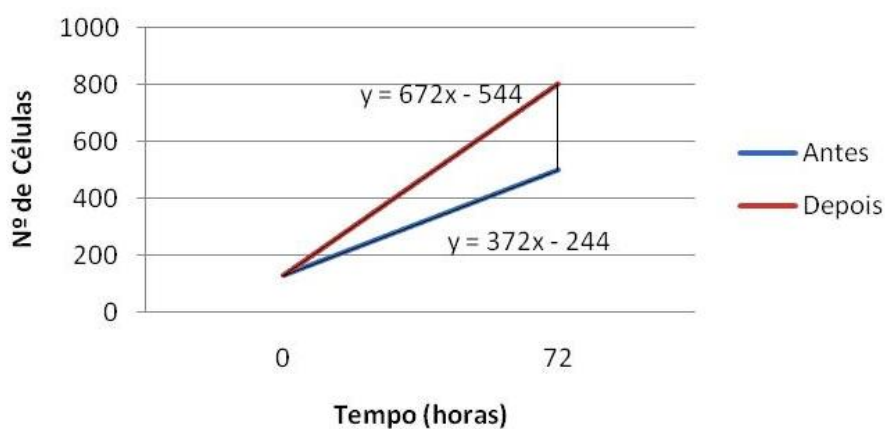


Figura 15 – Taxa de crescimento 6 antes e depois da irradiação das células, variação angular entre as duas retas 4,83°.

Taxas de Crescimento Tubo 7 Diferença Angular 6,29°

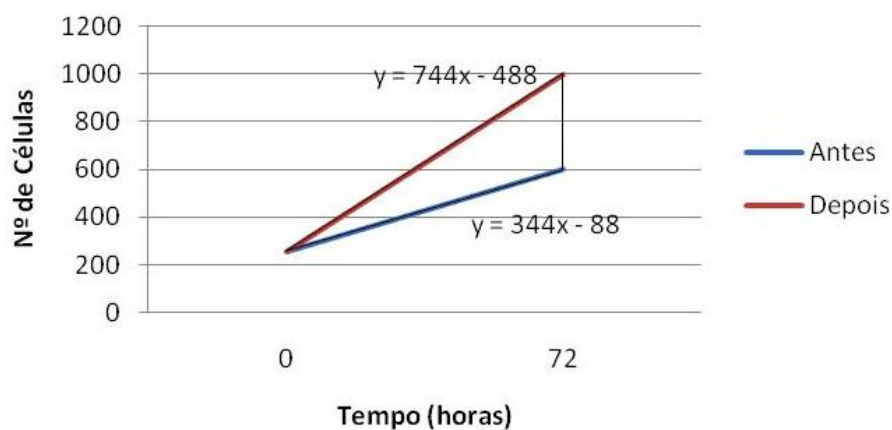


Figura 16 – Taxa de crescimento 7 antes e depois da irradiação das células, variação angular entre as duas retas 6,29°.

Taxas de Crescimento Tubo 8 Diferença Angular 6,50°

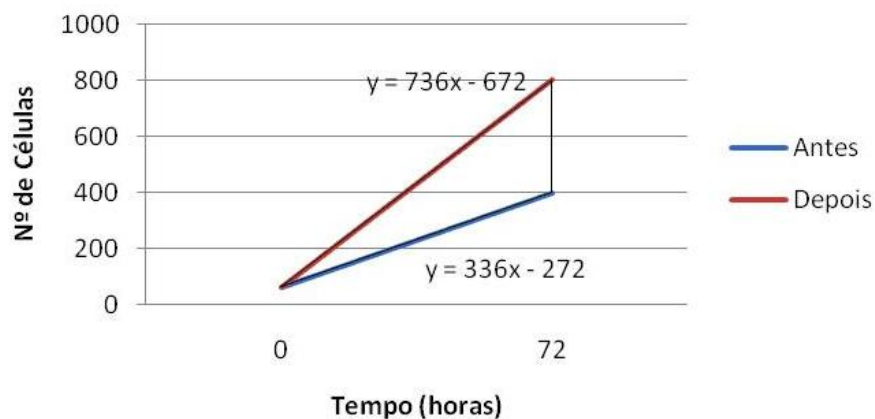


Figura 17 – Taxa de crescimento 8 antes e depois da irradiação das células, variação angular entre as duas retas 6,50°.

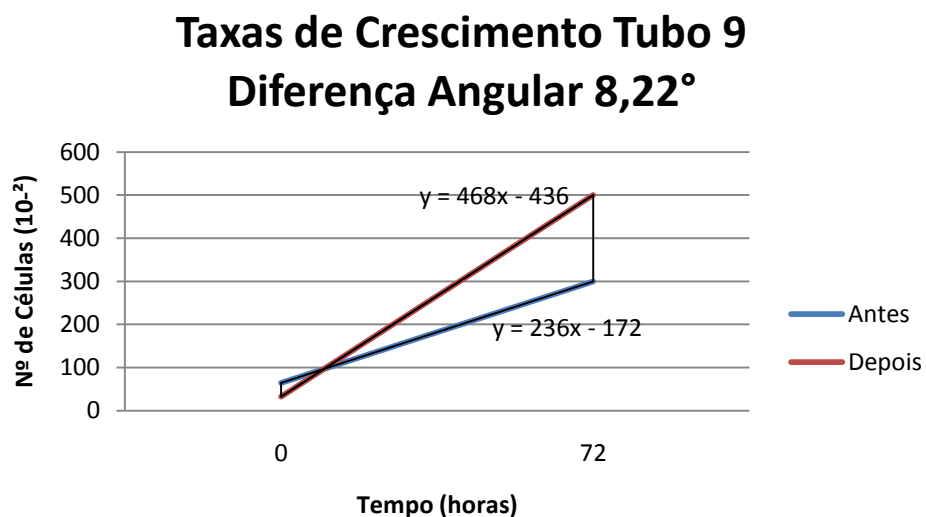


Figura 18 – Taxa de crescimento 9 antes e depois da irradiação das células, variação angular entre as duas retas 8,22°.

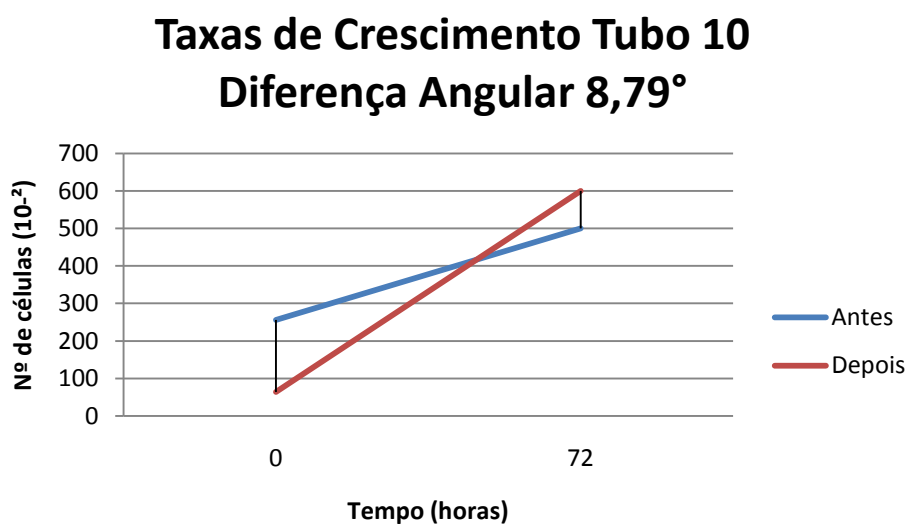


Figura 19 – Taxa de crescimento 10 antes e depois da irradiação das células, variação angular entre as duas retas 8,79°.

Taxas de Crescimento Tubo 11 Diferença Angular 9,74°

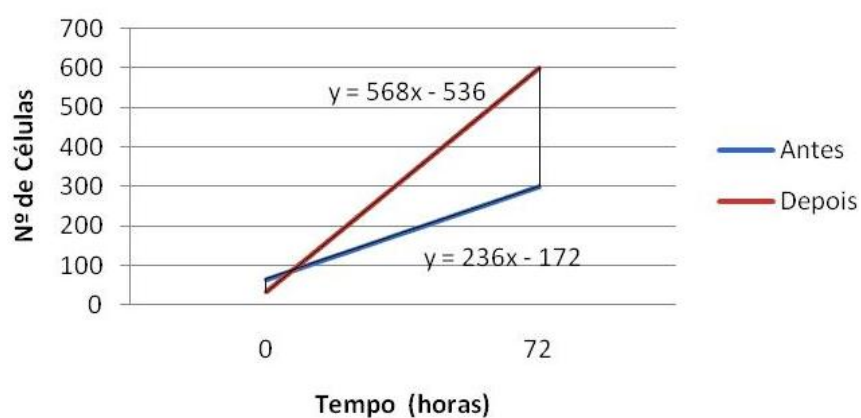


Figura 20 – Taxa de crescimento 11 antes e depois da irradiação das células, variação angular entre as duas retas 9,74°.

Taxas de Crescimento Tubo 12 Diferença Angular 10,59°

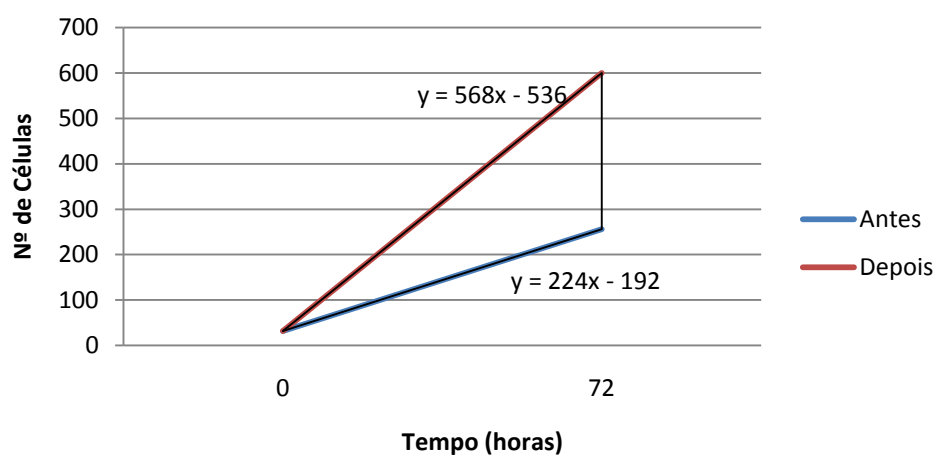


Figura 21 – Taxa de crescimento 12 antes e depois da irradiação das células, variação angular entre as duas retas 10,59°.

Taxas de Crescimento Tubo 13 Diferença Angular 12,91°

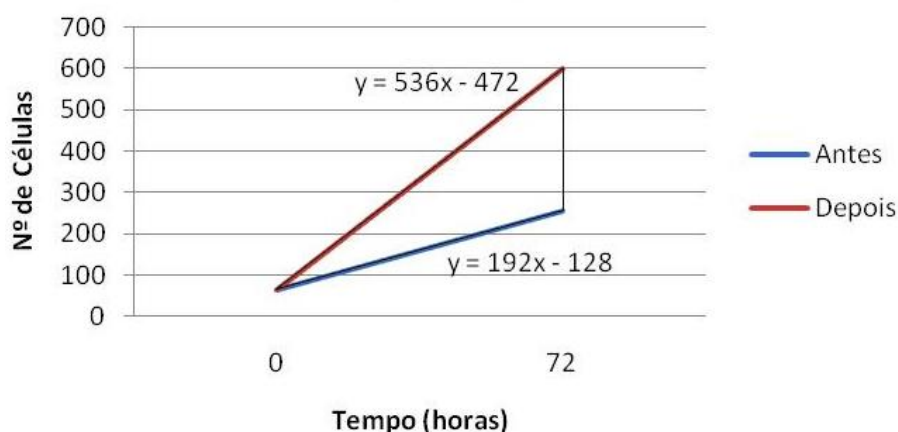


Figura 22 – Taxa de crescimento 13 antes e depois da irradiação das células, variação angular entre as duas retas 12,91°.

Taxas de Crescimento Tubo 14 Diferença Angular 23,98°

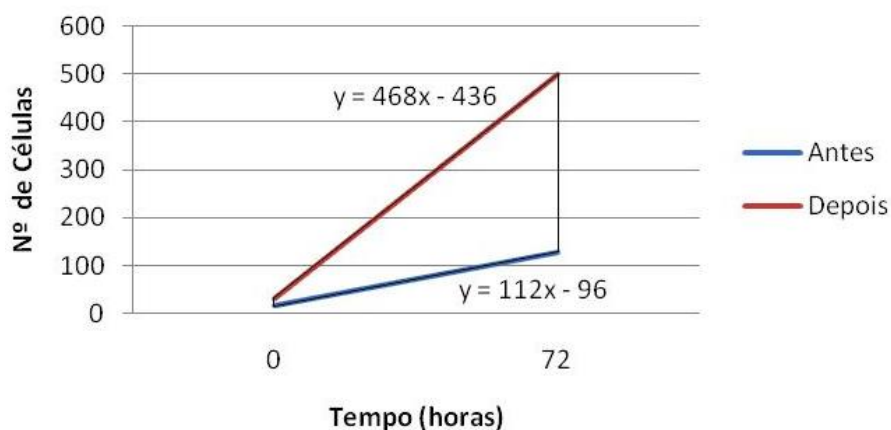


Figura 23 – Taxa de crescimento 14 antes e depois da irradiação das células, variação angular entre as duas retas 23,98°.

Taxas de Crescimento Tubo 15 Diferença Angular 24,12°

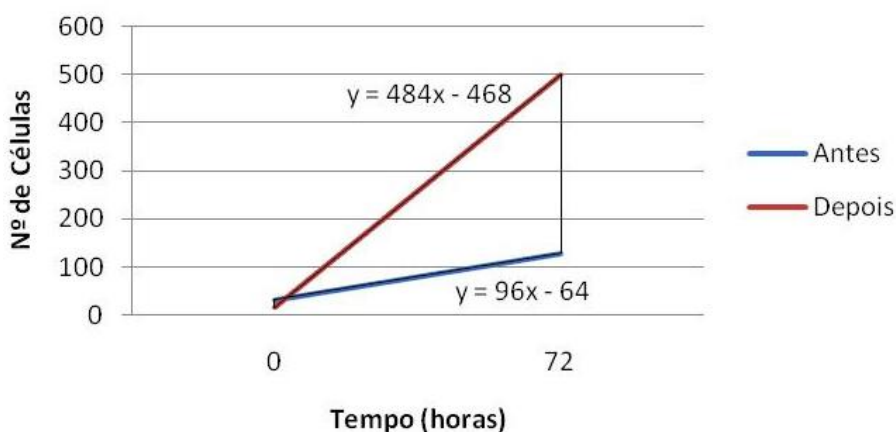


Figura 24 – Taxa de crescimento 15 antes e depois da irradiação das células, variação angular entre as duas retas 24,12°.

Taxas de Crescimento Tubo 16 Diferença Angular 26,01°

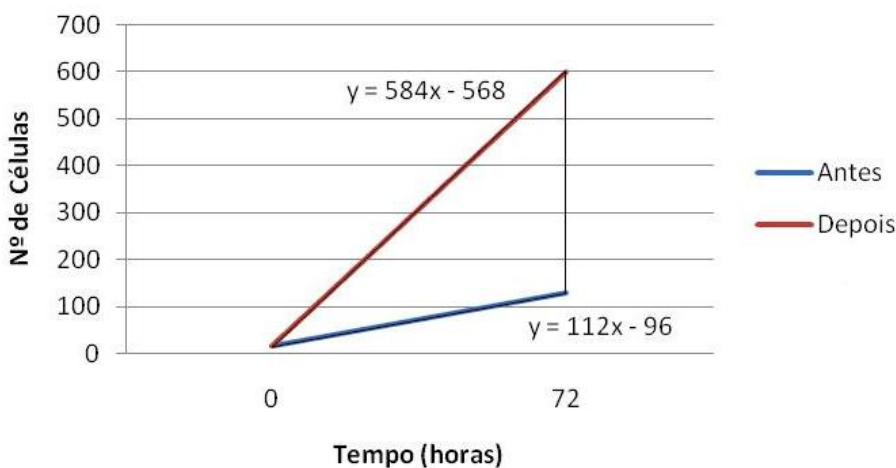


Figura 25 – Taxa de crescimento 16 antes e depois da irradiação das células, variação angular entre as duas retas 26,01°.